

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-508420

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)9月21日

(51) Int.Cl.* C 12 P 21/02 A 61 K 38/22 C 07 H 21/04	識別記号 ZNA H 9282-4B	序内整理番号 F I
	B 8615-4C 9281-4B 7729-4B	C 12 N 15/00 5/00
		A B
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平6-503790
(86) (22)出願日 平成5年(1993)5月17日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)11月18日
(86)国際出願番号 PCT/US93/04648
(87)国際公開番号 WO93/23541
(87)国際公開日 平成5年(1993)11月25日
(31)優先権主張番号 884, 811
(32)優先日 1992年5月18日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 885, 971
(32)優先日 1992年5月18日
(33)優先権主張国 米国(US)

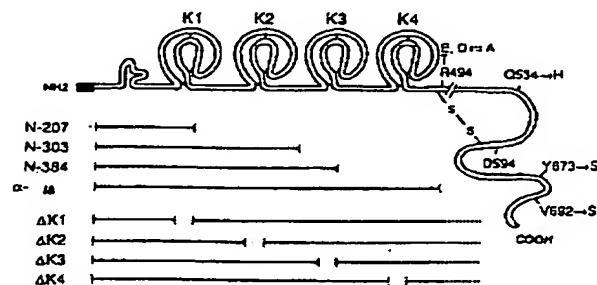
(71)出願人 ジェネンテク、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア94080、サン・フランシスコ、ポイント・サン・ブルーノ・ブルバード460番
(72)発明者 ゴドウスキ、ポール・ジェイ
アメリカ合衆国カリフォルニア94044、バシフィカ、ロマ・ヴィスター・テラス305番
(72)発明者 ロッカー、ナサリー・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア94121、サン・フランシスコ、フォーティース・アベニュー741番
(74)代理人 弁理士 青山 葉(外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 肝細胞成長因子変異体

(57)【要約】

本発明は肝細胞成長因子(HGF)アミノ酸配列変異体に関するものである。好ましい変異体は、HGFをその二本鎖型にインビボで変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性であり、そして/またはHGFのプロテアーゼドメイン内に突然変異を含む。



請求の範囲

1. HGFをインピゴでその二本鎖型に変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性である、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
2. ヒトHGF(huHGF)の変異体である、請求項1に記載の変異体。
3. HGFをその二本鎖型に変換することのできる酵素により認識される領域内の位置指定突然変異誘発によって一本鎖型に固定化された、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
4. HGFレセプターを結合させることのできる、請求項3に記載の変異体。
5. ヒトHGF(huHGF)の変異体である、請求項4に記載の変異体。
6. 野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸493、494、495または496位に、またはこれらと隣接してアミノ酸変化を有する、請求項5に記載の変異体。
7. 该変化が置換である、請求項6に記載の変異体。
8. 该変化が挿入または除去である、請求項6に記載の変異体。
9. アミノ酸494位がアルギニン以外のアミノ酸により占められている、請求項6に記載の変異体。
10. 该アミノ酸がグルタミン酸、アスパラギン酸およびアラニンより成る群から選ばれる、請求項9に記載の変異体。
11. 该変化が野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸493-496における少なくとも1個のアミノ酸の置換である、請求項6に記載の変異体。
12. 野生型huHGFのアミノ酸494位のアルギニンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
13. 野生型huHGFのアミノ酸495位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
14. 野生型huHGFのアミノ酸496位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
15. 野生型huHGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持している、請求項6に記載の変異体。

16. HGFのプロテアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変化を有し、且つ対応する野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持している、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
17. セリンプロテアーゼの活性部位に対応する領域に変化を含む、請求項16に記載の変異体。
18. 野生型ヒトHGF(huHGF)アミノ酸配列の534、673および692位のいずれかに、またはそれらと隣接して変化を含む、請求項16に記載の変異体。
19. 该変化が置換である、請求項18に記載の変異体。
20. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミン酸のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
21. 該アミノ酸がヒステジンである、請求項20に記載の変異体。
22. 野生型huHGFアミノ酸配列の673位のチロシンが別のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
23. 該アミノ酸が芳香族およびヘテロ環基を欠く、請求項22に記載の変異体。
24. 该アミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、システィン、グリシン、アラニン、およびバリンから選ばれる、請求項23に記載の変異体。
25. 该アミノ酸がセリンである、請求項24に記載の変異体。
26. 野生型huHGFアミノ酸配列の692位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
27. 该アミノ酸がバリンである、請求項26に記載の変異体。
28. 该アミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれる、請求項27に記載の変異体。
29. 该アミノ酸がセリンである、請求項28に記載の変異体。
30. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンまたは692位のバリンの置換をさらに含む、請求項24に記載の変異体。
31. 野生型huHGFアミノ酸配列の673位のチロシンがセリンに置換されている、請求項30に記載の変異体。

32. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンがヒステジンに置換されている、請求項31に記載の変異体。
33. 野生型huHGFアミノ酸配列の692位のバリンがセリンに置換されている、請求項31に記載の変異体。
34. さらに、野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンがヒステジンに置換されている、請求項33に記載の変異体。
35. HGFのプロテアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変化を有し、且つ対応する野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持している、請求項1-15のいずれかに記載の変異体。
36. 蛋白分解的開裂に対し耐性である、請求項1-34のいずれかに記載の変異体。
37. 実質上HGFレセプターの活性化ができない、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
38. 実質上HGF肝細胞成長因子活性を欠く、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
39. 野生型huHGFと比較して増大したレセプター結合親和性を有する、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
40. レセプター結合親和性の増大が、huHGFアミノ酸配列のレセプター結合ドメインにおける変化により達成される、請求項39に記載の変異体。
41. 该変化がhuHGFα鎖にある、請求項40に記載の変異体。
42. 该変化がタリングル1Fドメインにある、請求項41に記載の変異体。
43. 该変化が野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸159、161、195および197位により定位される部分の内部にある、請求項42に記載の変異体。
44. 该変化が野生型huHGFのアミノ酸173位にある、請求項42に記載の変異体。
45. 该変化が野生型huHGFのヘアピンドメイン内、ヘアピンドメインのN末端、またはヘアピンおよびタリングル1ドメインの間にあり、請求項41に記載の変異体。

46. 緩和的タリングル2ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
47. 缓和的タリングル3ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
48. 缓和的タリングル4ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
49. 請求項1-48のいずれかに記載の変異体をコードしているアタレオチド配列。
50. 請求項49に記載のアタレオチド配列を含み、且つこれを適当な宿主細胞内で表現することのできる、複数可能な表現ベクター。
51. 請求項50に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
52. HGF変異体をコードしている核酸を発現するよう請求項51に記載の宿主細胞を培養することからなる方法。
53. 宿主細胞培養から該変異体を回収することをさらに含む、請求項52に記載の方法。
54. そのレセプターに対する野生型huHGFの結合を競合的に阻害する量の請求項1-48のいずれかに記載の変異体を実験上評定し得る担体と混合してなる薬用組成物。
55. 必要な患者に請求項54に記載の組成物を投与することからなる、huHGFレセプターの活性化に付随する病理学的状態を処理する方法。

特表平7-508420 (3)

USA、87巻3200-3204頁(1990)；オカジマ等、Eur. J. Biochem.、193巻375-381頁(1990)】。

ヒトの血清から精製された主要な位に相当する α -hHGFの粗抗体は、ヒトのプロホルセンのアミノ酸R494およびV495の間の蛋白分解的部位により切断されるジスルフィド結合したペテロ二量体である。この開型工程は、440アミノ酸の α サブユニット(M.69kDa)および234アミノ酸の β サブユニット(M.34kDa)から成る分子を生成する。 β hHGF cDNAのスクレオチド配列は、 α および β 鎖がいずれもプレプロ前駆蛋白をコードしている单一オープシンリーディングフレーム中にあることを明らかにした。成熟 β HGFの予測された一次構造において、 α 鎖のCys487および β 鎖のCys604の間に機能S-S橋が形成されている(ナカムラ等、Nature、上記、を参照されたい)。メチオニン基で始まる54のアミノ酸が α 鎖のN末端に先行する。このセグメントは、特徴ある21残基の疏水性リーダー(シグナル)配列およびプロモーターを含む。 α 鎖はアミノ酸(a)55で始まり、4個のクリングルドメインを含んでいる。いわゆる「ヘアピンドメイン」は、野生型ヒトHGFのアミノ酸番号70-96を含んでいる。クリングル1ドメインはおよそa128からおよそa206まで及んでおり、クリングル2ドメインはおよそa211およびおよそa288の間にあり、クリングル3ドメインはおよそa303からおよそa383まで及んでいると想定され、そしてクリングル4ドメインは α 鎖のおよそa391からおよそa464まで及んでいる。種々のクリングルドメインの定位は他の蛋白(プロトロンビン、プラスミノーゲン)のクリングルドメインとの相図に基づくものであり、したがって上記の範囲は近似的なものに過ぎない。今までの所、これらのクリングルの機能は検定されていない。 β hHGFの β 鎖はセリンプロテアーゼの触媒ドメインと高い相図性を示す(プラスミノーゲンセリンプロテアーゼドメインに対し38%の相図性)。しかしながら、セリンプロテアーゼの触媒三つ組を形成する3個の領域のうち2個は β hHGFにおいて保存されていない。故に、そのセリンプロテアーゼ触媒ドメインにも拘らず、 β HGFには蛋白分解活性が無いようであり、また β 鎖の正確な役割は未知

明細書 肝細胞成長因子抗体

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、肝細胞成長因子(HGF)のアミノ酸配列変異体、係る変異体を調査する方法および手段、ならびにそれらを含む医薬組成物に関するものである。

1.1. 背景および関連技術の説明

HGFは最初、肝細胞に対する分裂促進因子として同定された【マイクロボロス等、Cancer Res.、44巻4414-4419頁(1984)；ラッセル等、J. Cell. Physiol.、119巻183-192頁(1984)】およびナカムラ等、Biochem. Biophys. Res. Comm.、122巻1450-1459頁(1984)】。ナカムラ等、上記、は、肝細胞を部分的に切削したラットの血清からのHGFの精製を報告した。その後HGFはラットの血小板から精製され、そのサブユニット構造が決定された【ナカムラ等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83巻6489-6493頁(1986)；およびナカムラ等、FEBS Letters、224巻311-316頁(1987)】。ヒト血清からのヒトHGF(huHGF)の精製は、ゴーダ等、J. Clin. Invest.、81巻414-419頁(1988)により最初に記載された。

ラットHGFおよびhuHGFは共に分子クローニングされており、「デルタ5-HGF」と呼ばれる5個のアミノ酸を欠失する天然に存在する変異体のクローニングおよび配列決定もされている【ミヤザワ等、Biochem. Biophys. Res. Comm.、163巻967-973頁(1989)；ナカムラ等、Nature、342巻440-443頁(1989)；セキ等、Biochem. and Biophys. Res. Commun.、172巻321-327頁(1990)；タシロ等、Proc. Natl. Acad. Sci.

のままである。HGFは4個の糖基化部位を含んでおり、これらは α 鎖の294および402位ならびに β 鎖の566および653位に位置している。ヒト白血球から精製されたcDNAの一端に、15塩基対のフレーム内欠失が検索された。このcDNA配列をCOS-1細胞中で一過性発現させると、クリングル1ドメインに5個のアミノ酸を欠く、コードされているHGF分子(デルタ5-HGF)は完全に機能的であることが判明した(セキ等、上記)。

成熟huHGFのN末端フィンガーおよび最初の2個のクリングルドメインに対するコード化配列を含むhuHGF転写物の、別のスプライスされた型に相当する、天然に存在する β hHGF変異体が、近年同定された【チャン等、Science、254巻1382-1385頁(1991)；ミヤザワ等、Eur. J. Biochem.、197巻15-22頁(1991)】。HGF/NK2と呼称されるこの変異体は、成熟HGFの複合的アンタゴニストであると追記された。

ラットHGFのアミノ酸配列と β hHGFのそれとの比較は、二つの配列が高度に保存され、且つ同じ性質の構造的特徴を持っていることを明らかにした。ラットHGF中の4つのクリングルドメインの長さは β hHGFと全く同じである。さらに、システィン残基が全く同じ位置にあり、これは類似の三次元構造であることを示唆している(オカジマ等、上記；タシロ等、上記)。

HGFレセプターは、c-Metプロトオンコジーンの産物【ボッターロ等、Science、251巻802-804頁(1991)；ナルディーニ等、Oncogene、6巻501-504頁(1991)】、190kDaヘテロ二量体(ジスルフィド結合した50kDaの α 鎖および145kDaの β 鎖)の実験チロシンキナーゼ蛋白【パーク等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻6379-6383頁(1987)】であると同定されている。このc-Met蛋白は、HGF結合の既145kDa β サブユニットのチロシン残基上でホスホリル化される。

HGFのレベルは、肝不全の患者の血漿中(ゴーダ等、上記)および実験的に肝の損傷を誘発した動物の血漿(リンドロー等、Hepatol.、13巻73

4-750頁(1991))または血清(アサミ等、J. Biochem.、109巻8-13頁(1991))中で上昇する。この亢奮の速度は速く、肝の再生の間のDNA合成の第一段に先行し、これはHGFがこの工程の開始に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。より最近になって、HGFが、メラノサイト、軟骨管細胞、ケラチン生成細胞、或る種の内皮細胞および上皮由来の細胞を含む種々な型の細胞に対する分裂促進因子であることが示された【マツモト等、Biochem. Biophys. Res. Commun.、176巻、45-51頁(1991)；イガワ等、Biochem. Biophys. Res. Commun.、174巻、831-838頁(1991)；ハン等、Biochem.、30巻9768-9780(1991)；ルビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻415-419頁(1991)】。興味深いことに、HGFは、インビトロで上皮および血管内皮細胞の増殖を促進する活性である「散乱因子」としても作用することができる【ストーカー等、Nature、327巻236-242頁(1987)；ワイドナー等、J. Cell. Biol.、111巻2097-2108頁(1990)；ナルディーニ等、EMBO J.、10巻2867-2878頁(1991)】。その上、最近HGFは上皮のモルフォゲンとして記載された【モンテサノ等、Cell.、67巻901-908頁(1991)】。故に、HGFは、腫瘍の侵襲および胚の発生において重要な役割であると仮定された。長期にわたるc-Met/HGFレセプターの活性化がある種の悪性腫瘍に観察された【ターパー等、EMBO J.、5巻2623頁(1986)；ジョルダーノ等、Nature、339巻155頁(1989)】。

HGFアミノ酸配列中の機能的に重要なドメインを固定するために、HGFの構造-活性関係をより詳細に理解することが望まれる。

HGFとそのレセプターとの相互作用を司るアミノ酸残基を同定することが特に望ましいであろう。

HGFの生物活性を司るアミノ酸残基を同定することもまた望ましいであろう。対応する成熟野生型HGFと比較して変化した(肝ましくは増強された)レセ

ブター結合親和性を有するHGFのアミノ酸配列変異体を提供することがさらに望ましいであろう。

対応する野生型HGFと比較してレセプター結合親和性は保持または増強されているがHGFの生物学活性が実質上無い、HGFのアミノ酸配列変異体を提供することもまた望ましいであろう。このような分子はHGF作用の競合的アンタゴニストとして挙動し得る。

対応する野生型HGFと比較してレセプター結合親和性が保持または増強されており且つ生物学活性が増強されているHGFのアミノ酸配列変異体を提供することはさらに望ましいであろう(HGFアゴニスト)。したがって、対応する成熟野生型HGFのレセプター結合親和性が保持または改善されているHGF変異体を提供することが本発明の一つの目的である。対応する成熟野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持し、且つHGFレセプター活性化が実質上できないHGF変異体を提供することが本発明の別の目的である。対応する成熟野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持し、且つ生物学的性質が改善されたHGF変異体を提供することがさらに別の目的である。

これらのおよびさらなる目的は当業者にとって明らかであろう。

発明の範囲

前記の目的は、野生型HGFアミノ酸配列の様々なドメイン内部にアミノ酸変化を有する、HGF変異体の供給によって達成される。

一つの態様において、HGFをインビボで二本鎖型に変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性であるHGF変異体が提供される。この変異体は、好ましくは、HGFを二本鎖型に変換することのできる酵素により認識される領域内での位置指定突然変異現象によって、一本鎖型で安定化される。

成る態様において、このような変異体は、野生型 $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸配列のアミノ酸493、494、495または496位にまたはこれと隣接してアミノ酸変化を有する。この変化は好ましくは野生型 $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸配列のアミノ酸493-496位における少なくとも一つのアミノ酸の置換である。

別の態様において、この変異体は、対応する野生型HGFの実質上完全なレセ

ブター結合親和性を保持し、且つ実質上HGFレセプター活性化ができない。増強されたレセプター結合親和性を持ち実質上HGFレセプターを活性化する能力を欠くHGF変異体が特に好ましい。このような化合物は対応する野生型HGFの競合的アンタゴニストであり、そして、充分な濃度で存在する時、野生型HGFがそれらのリガンドに結合するのを阻害することができる。

別の態様において、HGFのプロテオアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変化を有し、対応する野生型HGFのレセプター結合親和性を実質上完全に保持しているHGF変異体が提供される。

成る特定の態様において、これらの変異体は、対応する野生型HGFと比較して実質上保持されたまたは改善されたレセプター結合親和性を有し、HGFの生物学活性を実質上欠いている。このような化合物は、充分な濃度で存在するならば、HGF作用の競合的アンタゴニストとして作用するであろう。

別の特定の態様において、この変異体は、対応する野生型HGFと比較して、実質上保持されたまたは改善されたレセプター結合親和性を有し、HGFの生物学活性を実質上欠いている。この変化は、充分な濃度で存在するならば、HGF作用の競合的アンタゴニストとして作用するであろう。

成る特定の態様において、この内のHGF変異体は、セリンプロテアーゼの部位に対応する領域に変化を含む。より好ましくは、この変化は、野生型ヒトHGF ($\text{h}\mu\text{HGF}$) アミノ酸配列の534、673および692位のいずれかにあるか、またはこれらのいずれかに隣接している。

この変化は好ましくは選択である。

特に好ましい態様において、野生型 $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸534、673および692位の残基のうち少なくとも2個が別のアミノ酸によって置換されている。

本発明に係るHGF変異体の好ましい点においては、 $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸534、673位のチロシン (Y) および692位のバリン (V) の両者が別のアミノ酸によって置換されている。この変化は、野生型 $\text{h}\mu\text{HGF}$ のレセプター結合親和性は実質上保持するがHGFの生物学活性を実質上欠いているHGF変異体を生成するかも知れない。

一本鎖から二本鎖への開型部位の局所およびプロテオアーゼドメイン内の突然変異を有利に結び付けて、改善された生物学的性質が得られるかも知れない。

対応する野生型HGFに比較して増強したレセプター結合親和性を有する変異体が特に好ましい。レセプター結合親和性の増大は、例えば野生型HGFアミノ酸配列のレセプター結合ドメインにおける、そして好ましくはクリングル1ドメイン内部における変化によって達成される。

野生型 $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸配列のアミノ酸159、161、195および197位、またはアミノ酸173位により定義される部分内にアミノ酸変化を有するクリングル1変異体が特に好ましいが、クリングル1ドメイン内の他の位置もまたHGFのレセプター結合親和性および/または生物学活性に純粋な影響を及ぼすものと同定されている。

さらに、クリングル1ドメインに先行するアミノ酸位置、特にヘアピンドメインに対するNまたはC末端ちょうどに変化を有するアミノ酸配列変異体は、対応する野生型HGFと有意に異なる結合性および生物学活性を有することが見いだされている。

本発明に係る変異体は、複数のクリングル2および/またはクリングル3および/またはクリングル4ドメインを欠いていてよい。

全ての態様において $\text{h}\mu\text{HGF}$ アミノ酸配列変異体が好ましい。

別の態様において、本発明は、上記の変異体をコードしているDNA配列、保るDNA配列を含み且つ形成転換された宿主細胞中でこれらを発現することのできる複数可能な表現ベクター、形質転換された宿主細胞、および、該HGF変異体をコードしているDNAを発現させるよう、宿主細胞を培養することからなる方法に関するものである。

さらに別の態様において、本発明は、HGFアゴニストまたはアンタゴニスト特性を有するHGF変異体を含む治療用組成物に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、 $\text{h}\mu\text{HGF}$ の α および β サブユニットの断面図である。 α 鎖には、アミノ酸1-31を含むシグナル配列(囲まれている領域)、予想されたフィンガ

ーおよびそれぞれ3個のジスルフィド結合を有する4回のクリングルドメインが示されている。 $\text{h}\mu\text{HGF}$ のヘチモニ体 α/β 型の生成のための開型部位は、P1開型残基R494のすぐ後に統一している。この最後の残基は典型的にE、DまたはNのいずれかに置換されてHGF一本鎖変異体を生成した。この開型部位に既存 β 鎖はセリンプロテアーゼとの相同性を有する。 α および β 鎖はC487 (α) およびC607 (β) の間の唯一のジスルフィド結合により結合している(ナカムラ等、1988、上記)。 β 鎖内部の3個の残基は個々にまたは組み合わせて置換され、セリンプロテアーゼの真正な残基を再構成した。C末端切除変異体の成熟型の該部位を下に示す:N-207、第一のクリングルの後で除去; N-303、第二のクリングルの後で除去; N-384、第三のクリングルおよび β 鎖の後で除去。各クリングルの除去($\Delta K 1$ 、 $\Delta K 2$ 、 $\Delta K 3$ および $\Delta K 4$)が導入された変異体もまた示す。各々の場合において、除去はクリングル全体をC1からC6へと特異的に除く。

図2は、野生型 $\text{r}\mu\text{HGF}$ および一本鎖変異体のウェスタンプロットの結果を示している。野生型 $\text{r}\mu\text{HGF}$ (WT) または変異体R494E、R494AまたはR494Dのいずれかを発現する安定な293細胞または培養的にトランスクレクションさせた293細胞から得られた条件培地を、8%デシル硫酸ナトリウム-ボリアクリルアミドゲル上で還元条件下に分離しプロッティングした。このプロットを、主に α 鎖でエピトープを認識するポリクローナル抗HGF抗体と反応させた。マーカーの分子量(キロダルトン)は示されている通りである。さらに、 $\text{r}\mu\text{HGF}$ の α 鎖および非開型一本鎖型の位置を示す。このポリクローナル抗体は、検出される量の $\text{h}\mu\text{HGF}$ を発現しない、対照によりトランスクレクトされた293細胞にさえ存在する未確立バンド(•)と交差反応することに留意されたい。

図3: 野生型(WT) $\text{r}\mu\text{HGF}$ および一本鎖変異体の分裂促進活性(A)および競合的レセプター結合(B)。(A) 細胞骨格に記載されるように、WT $\text{r}\mu\text{HGF}$ および変異体が一次培養中のラット肝細胞のDNA合成を誘導する能力によって、生物学活性を測定した。代表的検定における二つの測定値の平均

c.p.m.を示す。対照細胞からの横幅上端はこれらの細胞においてDNA合成を阻害しなかった(バックグラウンドレベルより高いc.p.m.の増加が無い)。(B)競合的結合を行なうため、w1-rhuHGFまたは変異体を含むヒト293細胞の上清の様々な荷電度を、実施例2に記載のように、huHGFレセプター-EGF融合蛋白50 pMと共にインキュベートした。データは、代表的実験から競合しているリガンドのパーセンテージとして結合の阻害を表し、対照293細胞からのバックグラウンド値を差し引くことにより算出した。

図4:野生型rhuHGF、一本鎖またはプロテアーゼノインhuHGF変異体による、HGFレセプターの145 kDa β サブユニット上のリガンド誘導チロシンホスホリル化のウェスタンプロット。精製されたw1-rhuHGF(WT)、一本鎖(R494E)または二重プロテアーゼ変異体(Y673S、V692S)200 ng/mlを加えずに(-)または加えて5分間インキュベートしたA549細胞からの培養液を固相化し、抗HGFレセプター抗体で免疫沈降させ、抗ホスホチロシン抗体でプロッティングした。分子量(キログラム)は記載の通りである。

図5は、プラスミドpRK5.1をコードしているヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

図6は、プラスミドp.CIS.EBONをコードしているヌクレオチド配列を示す(配列番号15)。

発明の総括的な説明

1. 定義

本明細書中使用される「肝細胞成長因子」、「HGF」および「huHGF」という語は、野生型(ヒト)HGFのレセプターに特異的に結合することのできる(ヒト)成長因子を意味し、この成長因子は典型的には6個のドメイン(フィンガー、クリングル1、クリングル2、クリングル3、クリングル4およびセリンプロテアーゼドメイン)を持つ構造を有するが、にも拘らず、これが質的なHGFレセプター結合能を保持するならば、より少ないドメインを有していてもよく、またはそのドメインのうちいくつかが反復されていてもよい。この定義は特

に、セキ等、上記、により記載されるデルタ5 huHGFを含む。「肝細胞成長因子」とより「HGF」という語はさらに、任意のヒト以外の動物由来の肝細胞成長因子、とりわけラットHGFを含む。

「野生型ヒト肝細胞成長因子」、「天然ヒト肝細胞成長因子」、「野生型huHGF」、および「天然huHGF」という語は、天然配列のヒトHGF、即ち、天然供給源から精製された、化学合成された、または組み替えにより生成された、その成熟型、プレ型、プレプロ型、およびプロ型を含む。ミヤザワ等、1989、上記、またはナカムラ等、1989、上記により公表されているcDNA配列によりコードされている、天然配列ヒトHGFを指す。ミヤザワ等およびナカムラ等により報告されている配列は14のアミノ酸において異なっている。この相違の理由は全て明らかである訳ではない。多型性またはタローニングによる座標が可逆性の中に入っている。どちらの配列も、本発明の目的のために定義された前記の語によって特に包含されている。各細胞のアミノ酸配列における1またはそれ以上のアミノ酸の相違により表わされる、天然の対立遺伝子変異が存在し、且つこれらが個別に起こるということが理解されるであろう。本明細書中の変異体huHGF分子におけるアミノ酸の位置は、ミヤザワ等、1989、上記、の番号付けに従って示される。

「(HGF)生物活性」、「生物学的活性」、「活性」および「活性である」という語は、野生型ヒトHGFにより示される何らかの分裂促進、モトジェニックまたは形態形成活性を意味する。HGFの生物活性は、例えば肝細胞成長因子のインピトロまたはインピボ検定で判定することができる。一次培養におけるラット成体の肝細胞は、肝細胞の増殖を調節する因子の疎外に広く使用されている。したがって、HGF変異体の分裂促進作用は、HGF分子が一次培養におけるラット肝細胞のDNA合成を調節する能力を試験するために好適な検定、例えば実施例2に記載されるような検定において簡便に測定することができる。ヒトの肝細胞は、移植に容易でないと考えられる腫瘍上の全肝腫瘍、子供の移植に用いられる成人の肝臓から切り取った部分、胎児の肝臓および他の適応の外科手術の際に摘出された肝臓の残部から取得することもできる。ヒト肝細胞は、正常なラッ

ト肝細胞の一次培養を調製するために確立された方法と同様にして培養することができる。肝細胞のDNA合成は、例えば反復合成のための適当なヒドロキシ尿素对抗剤を用いた [³H]チミジンのDNAへの取り込みを測定することにより検定することができる。

肝細胞の増殖に及ぼすHGF変異体の効果は、肝臓の損傷不全および再生の動物モデル、例えば部分的肝切除、または四塩化炭素に起因する肝の損傷後のラット、D-ガラクトサミン誘発急性肝不全モデル等において、インピボで試験することもできる。適切なプロトコルに従って、肝癌、例えばマーナーフルインソチオシアナート(ANTRIT)を、再発できる有致性肝腫瘍の酵素およびビリルビンレベルの上昇をもたらすことのできる、既もって定められた濃度で、ラットに投与する。次いでこのラットを、試験されるべしHGF変異体で処理し、屠殺し、肝臓の酵素およびビリルビンのレベルを測定する。この肝臓はさらに、肝の損傷についても観察する。

本明細書中使用される「野生型(hu)HGFの実質上完全なレセプター結合活性を保持」という表現およびその文法的な実現は、そのHGF変異体のレセプター結合親和性が、野生型(hu)HGFがその天然のレセプターを結合させる親和性の約70%より低くない、好ましくは約80%より低くない、より好ましくは約95%より低くないことを意味する。

「HGFレセプター活性化が実質上できない」および「HGF生物活性を実質上欠く」という語は、HGF変異体により表わされる活性が、上記定義による確立されたレセプター活性化またはHGF生物活性の検定において、野生型(ヒト)HGFの各活性の約20%より低い、好ましくは約15%より低い、より好ましくは約10%より低い、最も好ましくは約5%より低いことを意味する。

「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という語は、全ての天然に存在するレーニーアミノ酸を指す。この定義はノルロイシン、オルニチン、およびホモシステインの包含を意味する。アミノ酸は一文字または三文字表記のいずれかによって指定される:

Acp D アスパラギン酸

Ile I イソロイシン

Thr T スレオニン	Leu L ロイシン
Ser S セリン	Tyr Y テロシン
Glu E グルタミン酸	Phe F フェニルアラニン
Pro P プロリン	His H ヒスチジン
Gly G グリシン	Lys K リジン
Ala A アラニン	Arg R アルギニン
Cys C システイン	Trp W トリプトファン
Val V バリン	Gln Q グルタミン
Met M メチオニン	Asn N アスパラギン

これらのアミノ酸は、それらの側鎖の化学的組成および性質に従って分類することができる。これらは大きく二つの群、荷電および非荷電に分類される。これらの群の名は、アミノ酸をより正確に分類するため、直隣に分けられる:

1. 荷電アミノ酸

陽性荷電: アスパラギン酸、グルタミン酸

陰性荷電: リジン、アルギニン、ヒスチジン

II. 非荷電アミノ酸

親水性荷電: セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン

脂族性荷電: グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

非極性荷電: システイン、メチオニン、プロリン

芳香族荷電: フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン

「変化」、「アミノ酸変化」、「変異体」および「アミノ酸配列変異体」という語は、野生型(ヒト)HGFと比較してそれらのアミノ酸配列に幾らかの相違を有するHGF分子を指す。通常この変異体は、それらの構造中に保持されている野生型(ヒト)HGFのFメイソン少なくとも約80%の相同性を有するであろうが、好ましくは保るドメインと少なくとも約90%がセローガスであろう。

置換HGF変異体は、対応する野生型HGF配列中少なくとも1個のアミノ酸残基が除去され、代わりに同じ位置に異なったアミノ酸が挿入されている事で

あってよく、または、同じ分子中2個またはそれ以上のアミノ酸が置換されている置換であってもよい。

本発明のアミノ酸と電荷および/または構造が異なる側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、HGF分子の活性に実質的な変化が得られる。この型の置換は、ポリペプチドバックボーンの構造および/または置換の領域における当該分子の電荷もしくは疎水性に影響を及ぼすと予想される。

電荷および/または構造において天然分子と類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、HGF分子の活性の中等度の変化が予想されるであろう。同様置換と呼ばれるこの型の置換は、ポリペプチドバックボーンの構造または置換の領域における当該分子の電荷もしくは疎水性のいずれをも実質上変化させないと予想される。

挿入HGF変異体は、野生型HGF分子中の特定の位置のアミノ酸と直接置換して1またはそれ以上のアミノ酸が挿入されているHGF変異体である。アミノ酸に直接置換して、とは、そのアミノ酸のヌカルギキシまたはヌーアミノ官能基のいずれかに結合していることを意味する。この挿入は、1またはそれ以上のアミノ酸であってよい。通常、挿入は1または2個の同種アミノ酸から成る。電荷および/または構造において挿入部位と置換するアミノ酸に類似しているアミノ酸を同類と定義する。これとは別に本発明は、挿入部位に置換するアミノ酸と実質上異なる電荷および/または構造を有するアミノ酸の挿入を包含する。

除去変異体は、野生型HGF分子中の1またはそれ以上のアミノ酸が除去されている変異体である。通常、除去変異体は、HGF分子の特定の領域において1または2個のアミノ酸が除去されているであろう。

本明細書全篇に使用されるhuHGFアミノ酸配列変異体を表現するための表記法を下に記載する。huHGFのポリペプチド鎖中の特定のアミノ酸の位置を数字で指定する。この数字は、ミヤザワ等、1989、上記、に開示されるような成熟野生型ヒトHGFポリペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸位置を指す。本出願においては、huHGF変異体中の同様に位置する残基は、実際の残基番号が分子内での除去または挿入のためその番号でなくとも、このような番号によつ

て表記する。これは、例えば、位置指定除去または挿入変異体において起こるであろう。アミノ酸は一文字コードを用いて指定する。置換されたアミノ酸は、そのアミノ酸のポリペプチド鎖中の位置を示す数字の左側に野生型アミノ酸を明示し、そしてこの数字の右側に置換された結果のアミノ酸を明示することによって表記する。

例えば、野生型huHGF分子のアミノ酸494位のアミノ酸アルギニン(R)をグルタミン酸(E)で置換すると、R494E huHGFと表記されるhuHGF変異体が生成する。同様に、野生型huHGF分子のアミノ酸673位のチロシン(Y)セリン(S)に、そしてアミノ酸692位のバリン(V)セラン(S)に置換することによって得られるhuHGF変異体は、Y673S、V692S huHGFと表記される。

除去変異体は、除去の各々の場のアミノ酸残基および位置を全て含めて示し、ギリシャ文字デルタ「Δ」を、示されたアミノ酸の左に位置させることによって明記される。1箇のアミノ酸の除去は、Δモ一文字コードおよび除去されたアミノ酸の位置を示す数字の左に位置させることによって示す。

挿入変異体は、挿入されたアミノ酸の周りに括弧「[]」を使用することにより表記し、挿入の位置は、その挿入の両側のアミノ酸の位置を示すことにより表記する。

本明細書に係るHGF変異体のアミノ酸配列における変化は、野生型ヒトHGFアミノ酸配列中のアミノ酸位置にて示される。(ミヤザワ等、上記)。様々な理由のためモローガスなアミノ酸配列を並べる方法は、当分において良く知られている。

「モードしているDNA配列」、「モードしているDNA」および「モードしているDNA」という語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を意味する。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序はポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。DNA配列はこのようにしてアミノ酸配列をコードしている。

「複数可能な表現ベクター」および「実現ベクター」という語は、一片の外来

DNAをその中に挿入させているかも知れない、通常二本鎖の、一片のDNAを意味する。外来DNAは、宿主細胞中に天然には見いだされないヘテロローガスなDNAとして定義される。このベクターは、外来またはヘテロローガスなDNAを適当な宿主細胞中に導入するために使用される。いったん宿主細胞に入るとこのベクターは宿主の染色体DNAとは独立して複製することができ、このベクターおよびその挿入されている(外来)DNAのコピーが幾つか生成され得る。さらにこのベクターは、外来DNAをポリペプチドに翻訳させる必要な要素を含んでいる。このようにして、外来DNAによりコードされているポリペプチドの分子が多数、迅速に合成される。

本発明の文脈において、「細胞」、「セルライン」、および「細胞培養」という表現は互換的に用いられ、このような表現は全て子孫を包含する。

「形質転換された(宿主)細胞」、「形質転換体」および「形質転換された」という語は、細胞中のDNAの導入を意味する。この細胞は「宿主細胞」と称する。導入されたDNAは通常、導入されたDNAの断片を含むベクターの冠をとっている。導入されるDNA配列は、宿主細胞と同じ種由来もしくは宿主細胞とは異なる種由来であってよく、またはどちらかの外来DNAおよびどちらかのホモローガスDNAを含むハイブリッドDNA配列であってもよい。形質転換体および形質転換された(宿主)細胞という語は、転写の回数に拘らず、当該一次細胞およびそれから誘導される細胞を包含する。全ての子孫は、故意のまたは偶然の突然変異のため、DNA含量が正確に等しい訳ではないこともまた理解されるであろう。初めに形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ遺伝または生物学的性質を有する突然変異体子孫が含まれる。

本明細書中使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」という技術は一般に、1987年7月28日登録の米国特許第4683195号およびカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、アスベル等編、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ヴィレイエインター・サイエンス、1991、2巻15章に記載のように少量の核酸、RNAおよび/

またはDNAの特定の断片を増幅する方法を指す。

本明細書中使用される「モノクローナル抗体」という語は、実質上均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、その集団を構成している個々の抗体は、少量存在するかも知れない、天然に存在する可能性のある実験動物を統一して同一である。したがって、修飾語句「モノクローナル」とは、別個の抗体の複合物ではない抗体の性格を示す。モノクローナル抗体は、抗セレクチンリガンド抗体の可溶(恒可変を含む)ドメインと不溶ドメインとのスプライシング(このうち1方だけがセレクチンを指向する)(例えば「ヒト化」抗体)、または恒頭と重頭とのスプライシング、または既存の恒頭または先代グロブリンクラスもしくはサブクラスの指定に拘らず、ヘテロローガスな蛋白との融合により生成されるハイブリッドおよび組み替え抗体、ならびに抗体フラグメント(例えばFab、F(ab')_nおよびFv)を包含する。キャビリー等、米国特許第4816567号; ダイジおよびラモイ、モノクローナル・アンティボディ・プロダクション・テクニクス・アンド・アブリケーションズ(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)、78-97頁(マーセル・ディッカー・Inc.、ニューヨーク、1987)。したがって修飾語句「モノクローナル」は、このような実質上均質な抗体集団から得られるような抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によってその抗体を生成することを必要としていると解釈すべきではない。

「免疫グロブリン」という語は一概に、通常、共に天然の「Y」立体配置でシスルフィド結合している恒頭または重頭を含むポリペプチドを指すが、それらの四量体または五量体を包含するそれらの間の別の結合もまたその範囲内にある。

免疫グロブリン(Ig)およびそれらの多くの変異体は既知であり、多数のものが組替え細胞培養で記述されている。例えば、米国特許第4745055号: EP256654号: フォークナー等、Nature、298巻286頁(1982); EP120694号: EP125023号: モリソン、J. Immun. 123巻793頁(1979); ケーラー等、Proc. Natl. Acad.

d. Sci. USA、77巻2187頁(1980) : ラソ等、Cancer Res.、41巻2073頁(1981) : モリソン等、Ann. Rev. Immunol.、2巻239頁(1984) : モリソン、Science、229巻1202頁(1985) : モリソン等、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、81巻6851頁(1984) : EP255694号; EP266663号; およびWO88/03559号を参照されたい。両構造された免疾グロブリン鎖もまた知られている。例えば、米国特許第4444878号: WO88/03565号; およびEP68763号ならびにそれらに引用されている文献を参照されたい。本発明に係るキメラの免疾グロブリン部分は、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgMから選ぶことができるが、好ましくはIgG₁またはIgG₃から選ぶことができる。

11. HGF変異体の選択

本発明は、HGFのアミノ酸配列変異体における構造-活性および構造-レセプター結合基團の研究に基づくものである。

本発明に係る或るHGF変異体は、一本鎖HGFプロセラをインシボでその二本鎖型に変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性である。このような酵素はトリプシン様プロテアーゼである。変化的早い時、この蛋白分解的開裂は、野生型h_uHGF配列のArg 494およびVal 495の間に起こる。蛋白分解的開裂に対する耐性は、糸ましくは、HGFをその二本鎖型に変換することのできる酵素により認識される領域内、そして糸ましくは野生型h_uHGF配列のアミノ酸残基493-496にあるLeu-Arg-Val-Val(LRVV)内の位置指定突然変異誘導によって達成される。本発明に係る変異体は、例えば、野生型ヒトHGFアノミ酸配列中アミノ酸493、494、495および496位にまたはこれらに隣接して、单一または複数のアミノ酸置換、挿入または除去を含んでいてよい。

好みい変化は、アミノ酸494位のアルギニンの、他の任意のアミノ酸、好みしくはグルタミン酸、アスパラギン酸またはアラニンによる置換である。一般に、この位置のアルギニンの、より小さい、非極性のまたは酸性のアミノ酸への

置換が一本鎖HGF変異体を生成させると信じられている。

これに代わって、またはこれに加えて、495位のパリンを別のアミノ酸に置換すると、一本鎖から二本鎖への開裂が遮断されると予想される。よりかさ高いアミノ酸、例えばチロシン、フェニルアラニン等がこの位置での置換に好ましい。

本免疫に係る別のHGF変異体は、HGFのプロテアーゼドメイン内の部位に変化があり、対応する（肝ましくはヒト）野生型HGFのレセプター結合能と性を実質上完全に保持している。プロテアーゼドメインは野生型h_uHGF配列のアミノ酸494位および495位の間の調整部位に残り、既知のセリンプロテアーゼの触媒ドメインと高度の相同意を示す。保存はセリンプロテアーゼの活性部位には適用されない。プロ酵素であるプラスミノーベンから形成されるヒトプラスミンにおいては、残基H142、Asp85およびSer181が触媒部位（触媒三つ目）を形成している。この触媒三つ組はセリンプロテアーゼにおいて高度に保存されている。h_uHGFアミノ酸配列においては、アスパラギンはアミノ酸594位に保存されているが、534位（プラスミンの42位に対応する）はヒスチジンではなくグルタミンにより占められており、そして673位（プラスミンの181位に対応する）はセリシンではなくチロシンにより占められている。ここに記載のプロテアーゼドメイン変化の好ましい構は、アミノ酸673位および534位の一方または両方を含む。これに代わって、またはこれに加えて、変化はh_uHGFアミノ酸配列の692位にあってよい。全ての例において、この変化は、肝ましくは天然h_uHGFアミノ酸配列のこれら的位置にある残基が、またはそれ以上の異なるアミノ酸により置換されたものである。

アミノ酸673位のチロシンは、好ましくは、から高い芳香族またはヘテロ基部分を持たないアミノ酸によって置換される。このようなアミノ酸は、セリン、スレオニン、アスパラギン、システイン、グリシン、アラニンおよびバリンを含む。好ましい立体において、この位置のチロシンはセリンにより置換されている。

アミノ酸 69 位のバリンは好みしくは極性アミノ酸、例えばセリン、スレオニン、アスパラギンまたはグルタミン、好みしくはセリンにより置換されている。

本発明に係るHGFアミノ酸配列変異体の好みしい群において、873位および92位の両者が前記アミノ酸のうちの1個、好みしくはセリンにより置換されている。このような変異体はさらにアミノ酸534位に変化(好みしくは置換)を含んでいてよい。後者の変化は、野生型からHGFアミノ酸配列のグルタミンの、ヒステジンによる置換であってよい。

プロテアーゼドメイン内の单一、二重または三重の突然変異を、野生型 HGF アミノ酸配列中のさらなる変化と合することができる。このようなさらなる変化は、例えば前記のような HGF 分子の一本鎖から二本鎖への露型部位またはその周辺とすることができ、実質上一本鎖型である寡聚体を生成することができる。

さらなる変化は、HGF分子のC末端またはクリングルドメイン中とすることができる。実例例に示すように既存のアミノ酸残基に加えて、クリングル1ドメイン内に変化を有するHGF変異体が極めて興味深い。本発明者等は、レセプター結合ドメインがHGF分子のフィンガーホールおよびクリングル1領域内に含まれることを見いだしているので、これらのドメイン内のアミノ酸変化は、本発明に係る変異体のレセプター結合性(および生物学活性)を有意に変えると予想される。クリングル構造の内部に最も露出している基質の変化(殆どは荷電基)は特に、HGF変異体のレセプター結合性および/または生物学活性に著しい変化をもたらすと思われる。

クリングル1ドメイン内の変化は好ましくは、野生型かヒuHGFアミノ酸配列のアミノ酸159、161、195および197位によって定義される区域内、または非ヒトHGFアミノ酸配列の対応する位置にある。別の好みのアミノ酸変化のための部位は、野生型かヒuHGFアミノ酸配列の173位にある。後者の位置はアミノ酸159、161、195および197位により定義される表面に比べて反応側面にあり、HGFの結合性および生物活性へのその関与の理由は、まだ十分明らかにされていない。

95 : R494 [D] V495 : R494 [A] V495 : R494 [Y] V4
 95 : R494 [F] V495 : R494E. Q534H : R494E. Y67
 3S : R494E. V692S : R494D. Q534H : R494D. Y67
 3S : R494D. V692S. R494A. Q534H : R494A. V67
 3S : R494A. V692S. R494E. Y673S. V692S : R49
 4D. Y673S. V692S. R494A. Y673S. V692S. R49
 4E. Q534H. Y673S. V692S : R494D. Q534H. Y67
 3S. V692S : R494A. Q534H. Y673S. V692S : E15
 9A : S181A : F162A. L163A. S165A. S186A : F18
 2A : L163A. S165A. S166A : Y167F : Y167A : R16
 8A : Q173A : Q173A. E174A. N175A : N193A : R19
 5A : R197A : N193A. E195A. R197A : K52A : D54A
 : K52A. D54A : H114A : H114A. E115A. D117A : E
 115A : D117A : 上記変化の、いずれかの組合せである変化：上記変化の、
 いずれかを含む△K3および／または△K4変異体：対応するデルタ5-βuHG
 F変異体およびヒト以外の動物HGF変異体。

III. HGF変異体の組み立て

位置指定突然変異研究を実施するために、例えはサムブルック等【セレキュレーション・クローニング: A Laboratory Manual】、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス、ニューヨーク(1989年)が開示するような当分野で知られる任意の技術を使用することができるが、オリゴスクレオド指定突然変異研究が、本説明に係るHCF変異体の製造に併走しある。当分野で良く知られているこの方法【アーデルマン等、DNA、2卷183頁(1983)、サムブルック等、上記】は、置換変異体の製造に特に好適であるが、除去および導入変異体の製造にも簡便に使用することができる。

認められるように、位置指定突然変異説究技術は典型的には、一本鎖型および二本鎖型の両方で存在するファージベクターを使用する。位置指定突然変異説究に使用する自家細胞ベクターは、例上げイシング菌、サード・クリーブランド・シン

ポジアム・オン・マクロモレキュールズ・アンド・リコンビナント・DNA (Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA)、A. ウォルトン編、エルセヴィア、アムステルダム (1981) に示されるようなM13ファージの上うなベクターを包含する。これらのファージは市販品を容易に入手でき、それらの用途は当業者には一般に良く知られている。これに代わって、一本鎖ファージ複製起点を含むプラスミドベクター (ウェイラ等、Meth. Enzymol. 1. 、153巻3頁 (1987)) を使用して一本鎖DNAを得ることもできる。

オリゴヌクレオチドは、クレア等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75巻5765頁 (1978)) により記載されるような当分野で良く知られる技術を用いて容易に合成される。

実施例1のHGF変異体の製造に用いられる特異的突然変異誘発法は、クンケル等、Methods in Enzymol. 1. 154巻367-382頁 (1987) によって記載された。

1以上のアミノ酸が置換されている突然変異体は幾つかの方法のうちの一つによって生成することができる。もしアミノ酸がボリペプチド鎖において接近しているならば、それらは、所望のアミノ酸置換全てをコードしている1個のオリゴヌクレオチドを用いて同時に突然変異させることができる。しかしながら、もしアミノ酸が互いに離らかの距離をおいて位置しているならば (例えば10アミノ酸以上離れている)、所望の変化を全てコードしている單一のオリゴヌクレオチドを作り出すのはより困難である。代わりに、二つの代替法のうち一つを使用することができる。第一の方法では、置換すべきアミノ酸各々について別々のオリゴヌクレオチドを生成させる。次いでこのオリゴヌクレオチドを一本鎖型DNAに同時にアニーリングし、そうすると鎖型から合成されるDNAの第二の鎖は所望のアミノ酸置換の全てをコードしているであろう。この代替法は、所望の突然変異体を創造するために2またはそれ以上の突然変異誘発の過程を含む。

野生型HGFまたは変異体分子をコードしているDNA配列に突然変異を作る、当分野で知られるもう一つの方法は、出発HGF分子をコードしているDNA配列を、制限酵素による消化によって適当な位置で開裂し、正しく開裂したDNA

を回収し、所望アミノ酸配列および平均塩基を有するボリリンカーのようなフランギング領域をコードしているオリゴヌクレオチドを合成し (または、ボリリンカーハーの代わりに、HGFコードDNAの端にも使用された制限酵素で合成オリゴヌクレオチドを活性化し、それにより結合端を作り出す)、そしてこの合成DNAをHGFコードDNA複合遺伝子の該段にライゲーションすることを含む。

PCR突然変異法もまた、例えば1987年7月28日登録の米国特許第4683195号およびカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、アッスベル等、編、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ、アンド・ウィリイーインターサイエンス、2巻、15章、1991に記載のように、本発明に係るHGF変異体の創造に応用できる。以下の考案はDNAに適用するものであるが、この技術はRNAにも適用し得るということが理解されるであろう。PCR技術は一般に以下の方法を指す。PCRにおいて少量の前型DNAが出発物質として使用される時、純型DNA中の対応する領域と配列が確かに異なるプライマーを使用して、そのプライマーが前型と相應する位置においてのみ純型配列と異なる特異的DNAフラグメントを比較的大量に作り出すことができる。プラスミドDNAに突然変異を導入するためには、プライマーのうち1個は突然変異の位置と一致するように、且つその突然変異を含むように設計し：他のプライマーの配列はこのプラスミドの反対の鎖の配列一つなりと同一でなければならないが、この配列は該プラスミドDNAのどこに位置していてもよい。しかしながら、第二のプライマーの配列は第一のプライマーの配列から200ヌクレオチド以内に位置し、その結果、最終的には、該プライマーを境界とするDNAの増幅された領域全体が容易に配列決定され得ることが好ましい。述べたようなプライマー対を使用するPCR増幅は、プライマーにより特徴される突然変異の位置で、そして純型のコピーは幾分誤りが起こり易いため、ひょっとすると他の位置で異なるDNAフラグメントの集団を生成する。生成物に対する純型の比率が非常に低いと、生成物DNAフラグメントの大半は所望の突然変異を組み込む。この生成物は、標準的DNA技術を用いて、PCR型としての技術を有するプラスミド中の対応領域と置き換えるのに使用される。突

然変異体第二プライマーを使用するか、または異なる突然変異体プライマーによる第二のPCRを実施し、得られた二つのPCRフラグメントを同時に三 (またはそれ以上) 部分ライゲーションでベクターフラグメントにライゲーションすることにより、突然変異を別々の位置に同時に導入することができる。

本発明に係るHGF変異体をコードしているcDNAは、さらなるクローニングまたは発現のために、複数可逆なベクター中に導入される。

好適なベクターは標準的組換えDNA法を用いて構成する。分離されたプラスミドおよびDNAフラグメントを開裂させ、整え、特定の様式でライゲーションして所望のベクターを作成する。

ライゲーションの後、ここで導入された外來遺伝子を有するベクターを適当な宿主細胞中に導入する。形質転換された細胞を、抗生素質、通常は、ベクター上のtet^rおよび/またはamp^r耐性遺伝子の存在のためにそれらに対し耐性となつたテトラサイクリン (tet^r) またはアンピシリン (amp^r) 上での増殖によって選択する。ライゲーション混合物が真核生物宿主細胞中に導入されたならば、形質転換された細胞はDHFR/MTK系により選択することができる。形質転換された細胞を培養中で増殖させ、次いでプラスミドDNA (プラスミドとは、目的の外來遺伝子にライゲーションされたベクターを指す) を分離する。次にこのプラスミドDNAを創取因縁作成および/またはDNA配列決定により分析する。DNA配列決定は一般にメシング等、Nucleic Acids Res. 9巻309頁 (1981) の方法またはマクサム等、Methods of Enzymology. 65巻499頁 (1980) の方法のいずれかによって実施する。

原核生物は、本発明の最初のクローニング工程のための好ましい宿主細胞である。これらは、大量のDNAの迅速な生産、位置指定突然変異誘発に用いられる一本鎖DNA純型の生成、多くの突然変異体の同時スクリーニング、および作り出された突然変異体のDNA配列決定のために特に有用である。本発明に係るHGF変異体を発現させるためには、真核生物宿主、例えば真核微生物 (酵母) および多細胞生物 (哺乳動物細胞培養) もまた使用することができる。本発明に係るHGF変異体の产生において使用するのに好適な原核生物、例えば大腸菌、真

核微生物および多細胞生物細胞培養、ならびに発現ベクターは、例えばWO 80/02798号 (1980年3月22日公開) に記載されている。

クローニングおよび発現方法は当分野で良く知られており、例えば前記の公開されたPCT特許出願 (WO 80/02798) に記載されている。

哺乳動物細胞が宿主細胞として使用される場合、トランスフェクションは一般に、グラハムおよびヴァン・デル・エブ、Virology. 52巻548頁 (1978) に記載されるような脂質カルシウム沈殿法によって実施する。しかしながら、注入、電気穿孔、またはプロトプラスト融合といったDNAを細胞中に導入するその他の方法もまた好適に用いられる。

宿主として酵母を使用する場合、トランスフェクションは一般に、ヒネン、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75巻1929-1933頁 (1978) に記載されるようにボリエチレンガリコールを用いて達成する。

実質的な細胞壁を含む原核生物細胞を使用する場合、好ましいトランスフェクションの方法は、コーエン等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 69巻2110頁 (1972) に記載されるような、カルシウムを使用するカルシウム処理、または、より最近では電気穿孔である。

HGF変異体は好ましくは分泌蛋白として培地から回収されるが、分泌シグナル無しで直接発現される場合には宿主細胞濃液から回収することもできる。この変異体がヒト起源以外の組み替え細胞で発現される場合、その結果この変異体はヒト起源の蛋白を全く持たない。しかしながら、蛋白に関して実質上均質の開型物を得るために、変異体を組み替え由来蛋白から精製する必要がある。第一段階として、培地または培養液を遠心して粒子細胞断片を除去する。

次に、常習的クロマトグラフィー法、例えばゲル通過、イオン交換、疎水性相互作用、親和、免疫親和クロマトグラフィー、逆相HPLC (沈殿、例えばエタノール沈殿、硫酸アンモニウム沈殿、または好ましくはセファロースに共有結合させた抗HGF (ポリクローナルまたはモノクローナル) 抗体による免疫沈降の適当な結合によって、変異体を、混在する可溶性蛋白から精製する。ヘパリンに対する高い親和性の故に、HGFはヘパリン、例えばヘパリーゼファロースカラム上で簡便に精製することができる。当業者には、天然HGFに過した

精製法は、組み替え細胞培養において発現される際のHGFまたはその変異体の性質の変化を考慮した条件を必要とするということが認識されるであろう。

上記のように、*h u HGF*は4つの推定のグリコシル化部位を含んでおり、それらは α -鎖の294および402位ならびに β -鎖の566および653位に位置している。これらの位置はラットHGFアミノ酸配列において保存されている。グリコシル化変異体は本発明の範囲内にある。

ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合またはO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖に炭水化物基が結合していることを指す。トリペプチド配列アスパラギン-メーセリンおよびアスパラギン-X-アスレオニン(ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への炭水化物基の酵素結合に対する認識配列である。O-結合グリコシル化とは、醇N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうち一つがヒドロキシアミノ酸、最も普通にはセリンまたはスレオニンと結合していることを指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシジンもまたO-結合グリコシル化に含まれ得る。O-結合グリコシル化部位は、例えばHGF分子のアミノ酸配列に対し1またはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加または置換することにより、修飾することができる。容易にするために、変化は通常、アミノ酸配列変異体に関して上に述べた技術を本質的に使用して、DNAレベルで致す。

本発明に係るHGF変異体に対するグリコシドの化学的または酵素的結合を用いて炭水化物基の該またはプロファイルを付加または増加させることもできる。これらの方針は、O-結合(またはN-結合)グリコシル化の可能なポリペプチドの生成を必要としないという点で有利である。使用される結合様式に応じて、例えば、(a)アルギニンおよびヒスチジン、(b)逆離カルボキシ基、(c)逆離ヒドロキシ基、例えばシテインの逆離ヒドロキシ基、(d)逆離スルフヒドリル基、例えばセリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンの逆離スルフヒドリル基、(e)芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基、に結合することができる。これらの方針は、WO87/05330(1987年9月11日公開)

、およびアブリントおよびリストン、CRC Crit. Rev. Biochem. 259-306頁(1981)に記載されている。

HGF変異体上に存在する炭水化物基は、化学的または酵素的に除去することもできる。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸または同様の化合物への曝露を必要とする。この処理は、結合型以外の殆どまたは全ての糖の開裂をもたらすが、ポリペプチドは無傷のままである。化学的脱グリコシル化は、ハイムディン等、Arch. Biochem. Biophys. 259巻52頁(1987)およびエッジ等、Anal. Biochem. 118巻131頁(1981)により記載されている。炭水化物基は、ソクタラ等、Methods Enzymol. 138卷350頁(1987)により記載されるような種々のエンドおよびエキソグリコシダーゼによって除去することができる。グリコシル化は、ダズキン等、J. Biol. Chem. 257巻3105頁(1982)により記載されるようにアニカマイシンにより抑制される。アニカマイシンは蛋白-N-アセチルグリコシダーゼ結合の形成を遮断する。

本発明に係るアミノ酸配列変異体のグリコシル化変異体は、適当な宿主細胞の選択によっても生成させることができる。例えば酵母は哺乳動物系とは異常に異なったグリコシル化を導入する。例に、セレクチン変異体の供給源とは異なった種(例えばハムスター、マウス、昆虫、豚、牛または羊)または組織(例えば肺、肝臓、リンパ、腎臓または皮膚)の起源を有する哺乳動物細胞が、変異体にグリコシル化を導入する能力について常習的にスクレーニングされている。HGF変異体分子の共有結合的糖鎖は本発明の範囲内に包含される。このような技術は、HGF変異体の標的アミノ酸残基を、選ばれた側鎖または末端残基と反応し得る有機試験品生産試験と反応させることによって、または選ばれた組み替えた蛋白結合に接する試験後修飾の機会を利用して、常習的に導入される。得られた共有結合的糖鎖は、生物活性、HGF変異体のイムノアッセイ、または組み替えた蛋白の免疫吸収液製造の抗HGF抗体の製造、に重要な役割の開拓を目的とする試験に有用である。例えば、ニンヒドリンとの反応後のこの蛋白の生物活性の完全な消失は、少なくとも一つのアルギニンまたはリジン残基がその活性のために決定的であることを示唆し、その後、選択された条件の下で確

定された側鎖の残基が、その修飾されたアミノ酸残基を含むペプチドフラグメントの分離によって同定される。このような技術は當分野における通常の知識の範囲内にあり、過度の実験をすることなく実施される。

二官能試薬による試験体形成は、HGF変異体の分子内凝集体の製造、ならびに検定または親和精製への使用のためにHGF変異体を水不溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋させるために有用である。さらに、細胞架橋の研究は、コンホーメーション構造についての直面的情報を提供するであろう。一般的に使用される架橋試薬は、1. 1-ビス(アゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルdehyド、N-ヒドロキシスルホニミドエステル類、ホモ二官能イミドエステル類、および二官能マレイミド類を包含する。メチル-3-[α -アシドフェニル]ジオアロビオミドのような試験体生成試薬は、光の存在下で架橋を形成することのできる光活性化中間体を生成させる。別途として、臭化シアン活性化炭水化物のような反応性水不溶性マトリックスおよび米国特許第3,959,642:3,969,287:3,691,016:4,195,128:4,247,642:4,229,537:4,056,635:および4,380,440号に記載の系反応性基質も、蛋白の固定化および架橋に使用される。

既述の試験法試薬は、発現されたポリペプチドに対する組み替えた蛋白の作用の結果である。グルタミンおよびアスパラギン残基はしばしば試験後修飾アミド化されて対応するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基となる。これとは別にこれらの残基は緩和的酸性条件下で脱アミド化される。これら残基のいずれの型も本発明の範囲内にある。

その他の中間試験法には、プロリンおよびリジンのヒドロキシ化、セリンまたはスレオニン残基のヒドロキシ基のホスホリル化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化が含まれる[T. E. クレイトン、Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. フリーマン・アンド・Co.、サンフランシスコ、79-86頁(1983)]。

その他の試験体は、非蛋白性ポリマーに共有結合で結合した本発明に係る新成

HGF変異体を含む。非蛋白性ポリマーは通常、親水性合成ポリマー、即ち天然では見いだされないポリマーである。しかしながら、天然に存在し、組み替えたまたはインヒブトロ法によって生成されるポリマーは、天然から単離されるポリマーと同様に有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロドンは本発明の範囲内にある。特に有用なのは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールのようなポリビニルアルキレンエーテル類である。

HGF変異体は、米国特許第4,640,835:4,496,689:4,301,144:4,670,417:4,791,192または4,179,337号に開示される方法によって、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン類のよう種々の非蛋白性ポリマーと結合させることができます。

HGF変異体は、例えばコアセルベーション技術または界面重合により製造されるマイクロカプセルに、コロイド敷物デリバリー系(例えばポリソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)、またはマクロエマルジョンに接することができる。このような技術はレミントンズ・ファーマシーナティカル・サイエンシズ(Remington's Pharmaceutical Sciences)16版、A. オソール著(1980)に開示されている。HGF変異体配列は、前記に定義された免疫グロブリン不変ドメイン配列に結合させることができます。得られた分子は一般に、HGF変異体-免疫グロブリンキメラと称する。このようなキメラは、本質的にはWO91/08298号(1991年6月13日公開)に記載のように組み立てることができる。

通常、HGF変異体は、免疫グロブリンの不変領域のN末端に、可変領域に代わってC末端が融合するが、セレクチン変異体のN末端融合もまた望ましい。好ましくは、HGF変異体の重複領域が融合の前に不活性化または除去される。

典型的には、この上うな結合は、少なくとも、免疫グロブリン重複の不変領域の親和性活性ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを保持する。結合は、さらに、不変ドメインのFと由分のC末端に、または重複のCH1もししくは重複の対応領域のN末端に直結行なわれる。これは通常、適当なDNA配列を組み立て、

それを組み替えた場合で発現させることによって達成する。しかしながら別途として、本発明に係るHGF変異体-免疫グロブリンキメラを既知の方法に従って合成することもできる。

融合がなされる正確な部位は重要でない。個々の部位は良く知られており、HGFは異体の生物学的、分子または結合特性を最適とするように選択することができる。

幾つかの思想において、ハイブリッド免疫グロブリンは、本質的にはWO91/08298号(上記)に開示されるように、单量体、またはヘテロもしくは中多量体として、そしてとりわけ四量体の二量体として組み立てられる。

好みの思想においては、HGFレセプターのための結合部位を含む配列のC末端を、免疫グロブリン、例えば免疫グロブリンG1のエフェクターモジュールを含む、抗体のC末端部分(特にFcドメイン)のN末端に融合させる。重複不変領域全体をレセプター結合部位を含む配列に融合させることは可能である。しかしながら、より好みには、ハイブリッド部位(これはIgGFcを化学的に規定し、重複不変領域の最初の残基を114とする内の残基216[コベット等、上記]、または他の免疫グロブリンの構成部位である)のすぐ上流のヒンジ領域で始まる配列を融合に使用する。特に好みの思想においては、レセプター結合部位を含むアミノ酸配列を、IgG1、IgG2、またはIgG3、重複のヒンジ領域およびC2およびC3またはC4、ヒンジ、C2およびFcドメインと融合させる。融合が行なわれる正確な部位は重要でなく、最適な部位は常習的な実験により決定することができる。

HGF変異体-免疫グロブリンキメラは、例えば、プロテインA精製、免疫組織化学、および免疫沈降技術において、抗体HGFに代わって使用することができる。HGF-HGFレセプター相互作用の阻害剤のスクリーニングを容易にすることができる。治療学的には、これらは対応するHGF変異体分子と比較して、より長い半減期といったような利点を付与することが期待される。

I V. 有用性組成物

増殖されたレセプター結合親和性を有するHGF変異体を使用して、野生型HGFがそのレセプターに結合することを遮断することができる。これにより、H

Gレセプターの活性化に付随する疾患状態、例えば慢性HGFレセプター活性化に付随する悪性腫瘍の発生が可能となる。

本発明に係る化合物は、HGF生成物を高率に許容し得る組合せと合することによる反応の活性に従って混合し、高率上有用な組成物を製造することができる。好適な組合せおよびそれらの割合は、オスロ等により低温されたレミントンズ・ファーマシュー・ディカル・サイエンシズ(Remington's Pharmaceutical Sciences)、16版、1980、マッタ・パトリック・C. O. に記載されている。これらの組成物は、典型的には、HGF変異体の有効量、例えば約0.5ないし約10mg/ml程度を適当量の組合せと共に含有され、患者への有効な投与に好適な高率に許容し得る組成物を製造する。変異体は、非経口的に、または有効な形で血流まで運搬されることが確実な形の方法によって投与することができる。

本発明の実施に使用されるHGF変異体の濃度段階に特に適した組成物は、無菌水溶液または凍結乾燥蛋白のような無菌の水和され得る粉末を包含する。典型的には、適当量の高率に許容し得る組合せまた、その割合を等級とするために、製剤中に使用される。

本発明に係る有用組成物の用量および所望の薬物濃度は、製造される組合せの用途に応じて変わり得る。ラットの実験における典型的な有効用量は、骨髓内ガラス注射として投与される約250μg/kgである。当分野で知られる、例えばモーデンティ等、Pharmaceut. Res.、8卷1351頁(1991)およびそこにも用いられている参考文献に開示されるような方法で、用量の種間比較を行なうことができる。

以下の実施例は本発明の実施のために現在考えられる最も簡便の様式を示すに過ぎず、本発明を限定するものと解すべきではない。

V. 実施例

プロトボルモンからα/β二量体への開裂ならびにクリンダルおよびプロテアーゼドメインの構造的および機能的重要性を決定するため、一連の組み替えたh-HGF(rhuHGF)変異体を生成させた。突然変異は、CMVを基盤とする発現プラスマドでhuhHGF cDNA中に導入し、各変異体を発現していると

ト93細胞の安定な集団からの条件培地を、HGF変異体の大きさおよび発現のレベルを監視するためのウェスタンプロットtingによって検定した。

各huhHGF異構体の濃度を二つの型のサンドイッチELISA検定により確認した。ELISAにより判明した発現レベルの相違はウェスタンプロット上に観察された相違と相關した。殆どの変異体について、発現のレベルは1-5mg/mlの範囲であった。発現レベルが0.6mg/mlより低い変異体については、その条件培地を確証した。

次に、一次培養中の肝細胞における分裂促進活性およびHGFレセプターに結合する能力を検定した。HGFレセプターの細胞外ドメインをヒトIgGの不变領域(Fc)に結合させ、結合を培養中で実現した。

rhuHGF変異体の組み立て、検定方法および種々の突然変異体によって得られた結果の分析を以下の実施例に記載する。

実施例1

huhHGF変異体の組み替え生成

A. 位置指定突然変異検出

プラスミドDNAの分離、ポリアクリルアミドおよびアガロースゲル電気泳動を、サムブルック等、上記、に開示されるように実現した。

CMVプロモーターを有する哺乳動物発現プラスミドpRK5.1(ジェネンテク・Inc.)を、培地中にHGF変異体の分泌をさせるhuhHGFの突然変異検出に使用し、生物学的および結合について直接検定した。この発現ベクターはpRK5.1の説明であり、その組み立ては、1989年3月15日公開のEP307247号に開示されている。このpRK5.1ベクターをコードしているアクリオチド配列を図5(記載番号1)に示す。

使用されたhuhHGF cDNAは、前に公開された728アミノ酸型に相当する(ミヤザワ等、1989、上記)。

突然変異検出は、入手し得る市販の大腸菌 λ gt10-ung-菌株を用い、クレカールの方法に従って実現した【クレカール等、Method. Enzymol.、154卷367-382頁(1987)】。インピトロ突然変異検出およびプライマーの配列決定に用いられるオリゴアクリオチドは、アブライド・バイオシス

テム、380A-DNA合成器を使用し、記載のようにして調製した【マテウチ等、J. Am. Chem. Soc.、103卷3185-3191頁(1981)】。所望の突然変異体を作り出すために、所望のアミノ酸置換をコードしている配列のオリゴアクリオチドを合成し、プライマーとして使用した。このオリゴアクリオチドを、標準的方法によって生成された一本鎖pRK5.1-huHS-Aとアニーリングした【ヴィエラ等、Method. Enzymol.、142卷3頁(1987)】。

3種のデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)、およびデオキシリボチミジン(dTTP)の混合物を、製造者によりキットで供給されるdCTP(aS)と呼ばれる修飾チオデオキシリボヌクレオシンと合し、一本鎖pRK5.1-huhHGFに加え、これに該オリゴヌクレオチドをアニーリングした。

この混合物にDNAポリメラーゼを加えると、突然変異を受けた塩基以外はpRK5.1-huhHGFと同一のDNA鎖が生成した。さらに、この新たなDNA鎖はdCTPの代わりにdCTP(aS)を含み、これが制限エンドヌクレアーゼ消化から保護する役割を果たした。ヘテロ二本錠の終端部に適当な制限酵素で切れ目を入れた後、この終端部をExo IIIヌクレアーゼにより、突然変異を有するオリゴマーを含む領域を通じて消化した。次いで分子のハット(hat)を部分的に一本鎖にしたまま反応を停止した。次に、4種の全デオキシリボヌクレオチド三磷酸、ATP、およびDNAリガーゼの存在下で、完全な二本錠DNAをモニターフラッシュによって生成させた。

以下のオリゴヌクレオチドを調製し、pRK5.1-huhHGF変異体分子の生成のためのプライマーとして使用した:

B194E_huhHGF: TIGGAATCCATTACAACTCGAGTTTTCGTTTGCGACAAAGAT

(記載番号2)

B194D_huhHGF: CAATGCCATTACCGCTCAATGTTTCG

(記載番号3)

B194A_huhHGF: CCACATTACACTCCAAATTGTTTCG

(記載番号4)

Q534B huHGF:AGAAGGGAAACAGTGTGCTGCA	(配列番号5)
Y673S huHGF:AGTGGGGCACCGAGATCCCGCT	(配列番号6)
V692S huHGF:TCACAGGACAGGAGAAATGACAC	(配列番号7)
ΔK1 huHGF:GCAATTCAACTTCTGAGTTCTAAATGTAGTC	(配列番号8)
ΔK2 huHGF:CATACTATTGTCACCTTCACCTCTGACAC	(配列番号9)
ΔK3 huHGF:TCATCTGACATATCTTCAGTGTGTTCAA	(配列番号10)
ΔK4 huHGF:TGTGGTATCACCTTCATCTGTGATGTGA	(配列番号11)
X-303 huHGF:ACCTTGGATGCAATTAACTGTGTTTC	(配列番号12)
X-384 huHGF:TTGTOCATGTGATTAATCACACT	(配列番号13)
α-線:CTTCCTGTCGGATCCATTACCTATGCCATTG	(配列番号14)

Y673S, V692S huHGF変異体は、この2つの突然変異を作るために用いられる両方のオリゴヌクレオチドを使用し、酵型としての野生型huHGFから得た。

上のプロトコルを用いて生成された突然変異体huHGF組み立て物を、コンピュートな細胞の調製および形質転換のための標準的培養カルシウム法(サムブルック等、上記)を用いて、大腸癌細胞MM294-tonAに導入した。MM294-tonA(これはT1ファージに対して耐性である)は、Tn10トランスポゾンのtonA遺伝子への導入およびこれに続く不正確な切取りによって開創された。次いでこの遺伝子を、トランスポゾン導入突然変異誘発[クレック

ナー等、J. Mol. Biol., 116巻125-159頁(1977)]を用いて大腸癌細胞MM294(ATCC31446)に導入した。

サムブルック等、上記、の標準的ミニプレート法を用いた細胞形質転換体の個々のコロニーからのDNA抽出物、このプラスミドをセファクリルCL6Bスピンドルラムを通過させることによりさらに精製し、次いで、配列決定ならばに側面エンダヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって分析した。

B. ヒト胚芽293細胞のトランスフェクション。

正しい配列を有するプラスミドを用いてヒト胚芽293細胞を煩雑カルシウム法によってトランスクレクトした。293細胞は6ウェルプレートに70%密閉となるまで増殖させた。huHGFプラスミドDNA試験体2, 5μgを1mMトリス-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227M CaCl₂, 150μlに溶解した。ここに50mM HEPES緩衝液(pH 7.35), 280mM NaCl, 1.5mM NaPO₄, 1.50μlを加え(搅拌しながら層下する)、25℃で10分間沈殿を生成させた。次いで、懸濁した沈殿を、6ウェルプレート中の個々のウェルに入った細胞に加えた。細胞の単層をこのDNA溶液の存在下に4時間インキュベートし、PBSで1回洗浄し、無血清培地で72時間培養した。安定な複数が形成されたならば、HGF cDNAを、エビソーム性CMV駆動発現プラスミドpCI-eEBONにサブクローニングした(製造はG.カシアンス、C.ホー、R.ウェーバー、S.ウィリアムズ、D.ゲッセルおよびD.リュンゲ)。pCI-eEBONはpRK5導体であって、その差異となっているアクリオチド配列は図6(配列番号15)に示されている。この組合を本オマイシン選択培地で直接選択した。

実験例2

検定方法

他のいかなる既知の成長因子とも似ていない構造の分子であるHGFの多面的活性に鑑み、この因子とそのレセプターとの分子相互作用を理解することが重要である。実験例1に記載のように生成されたhuHGF変異体を、一次培養中で肝細胞のDNA合成を調節する能力、およびhuHGFレセプターの可溶性型との結合について結合する能力を分析した。

A. 野生型huHGFおよびhuHGF変異体の蛋白定量

二つのモノクローナル抗体を用いる特異的二部位huHGFサンドイッチELISAを使用して、野生型組み替えhuHGF(WT-huHGF)、一本鎖およびプロテアーゼ変異体を定量した。微量定量プレート(マキシソーブ、ナシク)を、50mM胰島素緩衝液、pH 9.6に入れた1.0mg/mlのモノクローナル抗体huHGF抗体A3, 1, 2(1gG2a表型、親和性: 3.2×10⁻⁴mol/l)で、4℃で一夜後復した。プレートを、PBS中の0.5%BSA(シグマ)、0.01%メチオナール、pH 7.4で遮断し、引続を洗浄した後、遮断液をHGF試料を二つずつ調製し、平行してCHO-死滅されたrhHuHGF(40-0, 1ng/ml)を標準として使用した。これらを各50μlを、1:1500に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼとコンjugateさせたモノクローナル抗体rhHuHGF抗体B4, 3(1gG1表型、親和性: 1.3×10⁻⁴mol/l)50mlと共にRTで2時間同時にインキュベートした。0.04%O-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(シグマ)および0.012%v/v過酸化水素(シグマ)をPBSに加えることにより、基質を四塗し、100mlを、洗浄したプレートにRTで15分間加えた。各ウェルに2.25M硫酸50mlを加えることにより、反応を停止させた。405nmにおける吸光度をバックグラウンドとして差引きいた490nmにおける吸光度を、微量定量プレート読み取り儀で測定した(Vmax、モレキュラー・ダイバティシズ、メンロー・パーク、CA)。このデータをジュネンテク・Inc.の開発した四パラメータ曲線当てはめプログラムを用いて変形した。

HGFポリクローナルサンドイッチELISAを使用して、全てのクリンギル除去およびC末端切除変異体を定量した。簡便に述べると、微量定量プレート(ナシク)を、5mg/mlのモルモットポリクローナル(抗CHO死滅rhHuHGF)1gG抗体同型物(ジュネンテク・Inc.)で上記のように被覆した。この抗体は、ウェスタンプロットの目視調査と比較する時、HGF死滅型のならずrhHuHGFをも認識するので、HGF変異体の監視に理想的である。プレートを遮断し、293細胞上清の2倍濃度希釈液(1:103-6, 106)を加え、4℃で一夜インキュベートした。精製されたCHO死滅rhHuHGF(1

00-0, 7.8ng/ml)を標準として使用し、平行してインキュベートした。プレートを洗浄し、同じポリクローナル抗体の1:500希釈(およそ400ng/ml)と共にインキュベートしたが、この場合は、変異体の検出のため西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートさせた(上記を参照されたい)。ウェスタンプロットティングを実施して、見抜かれたHGF変異体の大きさを測定した。これについては、標準的方法を用い、ポリクローナル1gG抗体調製物(500ng/ml)を使用してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンプロットティングを実施した。化学発光センサス検出法(アマーシャム)およびヤギモルモットIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(1:5000)を、製造者の記載に従ってプロットの発色に使用した。

B. 可溶性HGFレセプター結合検定

HGFの許可への結合に関する先の研究は、huHGFが高い親和性でその細胞表面レセプターに結合できることを示した(Kd=24-32pM;ヒグチおよびナカムラ、Biochem. Biophys. Res. Comm., 174巻831-838頁(1991))。本発明者は、細胞表面硫酸ヘパリンプロテオグリカンへのHGFの非特異的結合の故に、可溶性型のレセプターを用いてHGF結合を調べることを選んだ【ナルディーニ等、EMBO J., 10巻2867-2878頁(1991)】。

細胞上清(もし濃度が600ng/mlより低ければアミコンフィルターで濃縮する)を、293細胞から発現され分離される、ヒトIgGのFc不変領域に結合させたヒトHGFレセプター(huHGF)の細胞外Fマインヘー、CH₀発現¹⁴、rhHuHGF(2-5×10³C1/mmol、T.ジョンソン、ジュネンテク・Inc.の好意により提供された)の結合を培養内で遮断する能力について試験した。

1. huHGF-IgG4マウスの組み立て

huHGFをコードしている全長のcDNAタローンを、cDNAライブライマーおよびPCR増幅から分離された部分的cDNAを結合することにより組み立てた。7ミリ板1-270に対するコード化配列を、50量体のオリゴヌクレオチド(5'-ATGAAGGGCCCCCGCTGTGCTTGCACCTGG

CATCCTCGTGCCTGTTTACCC-3') (配列番号16) でスクリーニングされたヒト胎盤cDNAライブラー (T. メイソン、ジェネンティにより提供された) から分離した。アミノ酸809-1380をコードしている配列は、オリゴヌクレオチドプローブ (5'-CACTAGTTAGGATG GGGCACATGTCTGTCAGAGGATACTGCACCTGTCGG CATGAA CCGT-3') (配列番号17) でスクリーニングされたヒト肝細胞ライブラー (ストラガリエン) から分離された。

ライブラーの平板培養、ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄に対する条件は記載の通りであった [ゴドフスキ等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86卷8083-8087頁 (1989)]。PCRを用いて、A549細胞からHGF-rの核酸271-808を含むcDNAクローニング (c-met) を分離した。モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素およびベセダ・サーサー・ラボラトリーズにより供給された酸性核を使用する100 μlの反応中で、HGF-rに対し特異的なプライマー (5'-TAGTACTA GCACTATCATGTC-3') (配列番号18) を用いる逆転写に、1.0 μgのmRNAをRNAを使用した。この反応混合物の10分の1をPCR増幅に使用した。このPCR反応は、10 μlの逆転写反応液、10 mM KC1、20 mMトリス-HCl (pH 8.8)、10 mM (NH4) SO4、6 mM MgSO4、0.1% Triton X-100、1 UのゲムントDNAポリメラーゼ (ニューヨーク・イングランド・バイオラブズ)、ならびに前進プライマー (5'-TTTA CTTCTTGACGGTCCAAAC-3') (配列番号19) よりも逆行プライマー (5'-CAGGGGGAGTTGCAGATTCTAGCTGT-3') (配列番号20) 各々50 pmolを含有する100 μl容量で実施した。30サイクルの変性 (95°C 1分間)、アニーリング (55°C 45秒間) よりも伸長 (72°C 2分間) の後、PCR生成物を低融解温度アガロースゲルから回収した。全長のHGF-r cDNAをベクターpRK7にサブクローンングし (1990年3月22日公開のWO90/02798号を参照されたい)、二本鎖DNA配列決定をジオキシタクレオチド法により実施した。

h u HGF-rの細胞外ドメインのコード化配列を、二段階の工程でヒトIgG

1重鎖のそれに融合させた。PCRを用いて、HGF-rアミノ酸929のコード化配列に対する3'に唯一のBstE II部位を有するフラグメントを生成させた。72°Cで3分間の延伸時間、および40 ngの全長HGF-r発現ベクターを酵母として使用する外は上記のようにして、5'プライマー (ベクター中、HGF-rコード化配列の上端に位置する) よりも3'プライマー (5'-AGTTTT GTCGGTGACCTGATCTCTGATCTGGTTGAACATAT TAC-3') (配列番号21) を、100 μlの反応中で使用した。增幅の後、このPCR生成物をこの組み立て物の唯一のBstE II部位を介してヒトIgG-γ1重鎖cDNAに結合させた [ベネット等、J. Biol. Chem., 266卷23060-23067頁 (1991)]。導入された組み立て物は、BstE II部位 (アミノ酸VおよびTのコード化配列を含む) を介してヒトIgG-γ1重鎖のアミノ酸216-443のコード化配列に結合された、h u HGF-rのアミノ酸1-929のコード化配列を含んでいた。この組み立て物の配列決定は上記のように実施した。

2. 総合検定

ウサギ抗ヒトIgG Fc特異抗体 (ジャクソン・イミュノリサーチ) 1 mg/mlにより4°Cで透析した分割可能な低量蛋白ブレート (ナンク) で結合検定を実施し、ブレートを0.05%トッケン20 (バイオラド) を含有するPBSで洗浄後 (洗浄) 、0.1%BSAを含有するPBSで透析した後、この同じ透析液に、ウェル当たり25 μlの50 pM I25I-rhuHGFを加えた。各ウェルに、50 μlの細胞上清の透析液を加え (1:25-1:6000) 、精製したCHO発現rhuHGF (25000-0.064 pM) または培地を全く同じように加えた。競いて、50 pMのHGFレセプター: IgG融合蛋白25 μlを加え、ブレートを適切に透析しながらインキュベートした。4時間後、平衡に達した時にブレートを洗浄し、ウェルをガムマカウンターで個別に計数した。か特異的に結合した放射活性の量は、HGFレセプター: IgGを500倍過剰の非標的rhuHGFとインキュベートすることによって判断した。各蛋白の解離定数 (Kd) を、ELISAにより決定されたh u HGF濃度を使用し、本質的には記載のようにして (デブラン等、1989 [?]) 、当てはめられた。

た阻害曲線からIC50において算出した。

C. 生物学的検定

WT h u HGFおよび変異体の生物学活性を、一次培養中のラット肝細胞のDNA合成を導導する能力によって測定した。肝細胞は、公開されている液体技術に少しの改良を加えて分離した [ガリンおよびヘインズ、J. Biol. Chem., 150卷2269-277頁 (1975)]。簡便に述べると、雌のスプラグド・ドレイリット (160-180 g) の肝臓を、0.02 MコラゲナーゼIV型 (シグマ) を含有する無Ca++Hepes緩衝培液100 mlにより、門脈から灌流した。20分後、この肝臓を摘出し、緩衝液に入れ、種やかに搅拌して肝細胞を結合組織および血管から分離し、ナイロンメッシュで通過した。次に、細胞を遠心により洗浄し、ベニシリン (1000 U/ml) 、ストレプトマイシン (100 mg/ml) 、L-グルタミン (2 mM) 、微量元素 (0.01%) 、トランスフェリン (10 mg/ml) よりアプロチニン (1 mg/ml) を含有するヴィリアムズ培地E (シグマ) 中に 1×10^6 細胞/mlで再培養した。精製されたCHO発現rhuHGF (1-0.31 mg/ml) と、293上清 (1:4-1:256) または培地のいずれかの2倍透析母液の存在下で、肝細胞を96ウェル微量定量ブレート (ファルコン) 中でインキュベートした。37°Cで4時間インキュベートした後、0.5 mCiの3H-Tdr (1.5 Ci/mmol、アマーシャム) を各ウェルに加え、さらに16時間インキュベートした。細胞を滤紙上に吸収し、これを洗浄し、乾燥し、シンチレーション液の添加後、ベックマン計数器で計数した。それぞれのh u HGF変異体について、単位/mgで表現される活性 (SA) も、ELISAで得られるHGF濃度を用いた半最大増殖 (1単位/ml) として定義する) において算出した。

D. A549細胞上でのチロシンホスホリ化の説明

ヒト肺癌細胞 (A549) の单層を、10%牛胎児血清を含有するRPMI 1640培地中で培養し、5%CO₂を含む加温充満気下に37°Cで維持した。血清瘤細胞を200 ng/ml rhuHGFと共にまたは無して37°Cで5分間インキュベートし、50 mM Hepes、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EGTA、10%グリセロール、1% Triton X-

100およびプロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する溶媒緩衝液で抽出した。この細胞液を抗Met-COOH抗体によって免疫沈降させ、抗ホスホチロシン抗体でプロットティングした (上記のウェスタンプロットティングを参照されたい)。

実施例3

開裂部位突変変異体の分析

プロチアーゼの開裂部位は、通常、P1位に酸性残基を、そしてP'1位およびP'2位に二つの疏水性アミノ酸残基を含み、これらは認識されるペプチド結合の後に接着している。認識されたh u HGFの開裂部位 (P1 R494、P'1 V495、P'2 V496) はこの意見に合致する。本発明者等は、P1 R494をD、E、またはAのいずれかに置換することによりh u HGFの開裂を遮断しようとした。これらの既存において発現されるWT rhuHGFの主要な型は、見かけの分子量69 kDaを有するα版の存在により判断されるような二本鎖の物質に開裂される (図2)。透析条件下においてこれらの変異体は單一のバンドとして、予想される一本鎖HGFの大きさ94 kDaに移動することから、これらの突然変異の名々はr hu HGFのプロセシングを遮断するらしく思われた。これらの変異体は、一次培養中の肝細胞の増殖を抑制する能力を全く失っていた (図3A)。しかしながら、これらの変異体を、HGFレセプター: IgG融合蛋白との結合についてWT rhuHGFと比較する能力を分析すると、それらの阻害曲線はWT rhuHGFのそれと大体似合っていた (図3B)。これらの曲線から決定されたKdは、WT rhuHGFが高い親和性 (50-70 pM) でこの結合蛋白に結合することを示し、一方、全ての一本鎖変異体はWT rhuHGFと比較しておよそ2ないし10倍のKd (100-500 pM) を示した。WT rhuHGFと比較した残余の肝細胞増殖活性およびレセプター結合能力として、少なくとも三つの独立した検定の結果を算出しまとめる。

本発明者らの結合研究は、WT rhuHGFが、ヒゲチウムナカムラ (1991) により肝細胞上に見いだされたものに類似の、单一クラスの高親和性結合部位 (50-70 pM) を有する可溶性レセプター結合蛋白と結合することを示した。しかしながら、この可溶性レセプターは実際には、IgGのFc部分に

あるヒンジのジスルフィド橋によって結合している二量体であることから、四捨上でのHGFの結合は多少異なるかも知れない。

全ての一本鎖変異体の特異活性(SA)対Kd比の直線比較は、これらが、は被された濃度において不活性であり(SA<3%)。一方レセプター結合親和性は2~3の因子によって低下するのみであることを示した。

これらの結果は、HGFの二本鎖型への開裂が分裂促進活性に必要であること、即ち、一本鎖HGFはプロマイトジエンであって、HGFの非開裂型は、親和性は低いものの、HGFレセプターに結合することを、強く立証している。

始鏡から分離された【ヘルナンデス等、(1992)、J. Cell. Physiol. 151、(印刷中)】またはトランスクレクションされたCOS細胞中に発現された【ルビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88巻415~419頁(1991)】HGFの主要な型は、一本鎖型である。分裂促進検定で試験する内、この一本鎖型のHGFは生物学的に活性であることが見だされている。本発明者等のデータと共に考え合わせると、この事は、この一本鎖HGFは分裂促進�定の間は活性化されて二本鎖型となっていることを示唆している。

第二の所見は、本発明者等の結合検定により示唆されたように、一本鎖変異体はHGFレセプターと結合する実質的な能力を保持しているということである。この事により、一本鎖HGFは不活性な状態で細胞表面HGFレセプターにインピボで結合し、その後適切なプロテアーゼにより活性な二本鎖型に開裂され得るという興味深い可能性が出てくる。

実施例4

プロテアーゼドノイン突然変異の影響

HGFのプロテアーゼドノインの観測的重要性を解明するために、可能性あるセリンプロテアーゼ活性部位を再構成するための單一、二重および三重突然変異を実施した。これらの変異体の組み立ては実施例1に記載されている。

本発明者等は、單一、二重または三重突然変異のいずれかとして、HGF残基Q534をHに、Y673をSに、またはV692をSに変更換えた。分裂促進活性およびレセプター結合に及ぼすそれらの影響の分析は、單一突然変異Q534Hはwt-rhuHGF(それぞれ3.3~104単位/mgおよび70pM)

と比較した場合、SA(5.2×104単位/mg)またはKd(80pM)のいずれも有意に変化しないが、一方Y673SおよびV692Sは、SAをそれぞれおよそ10倍以上低下させることを示した。実際これら二つの変異体は、WT-rhuHGFについて見られる最大ブラーに匹敵することはなかった(wt-rhuHGFのおよそ50%)。興味深いことに、これらの変異体はWT-rhuHGFと類似のKdを示した。他の二重および三重変異体も全てHGFレセプターを結合させる能力を保持していたが、明らかに低下したSAを示した(第1表)。二重変異体Q534H、Y673SおよびV673S、V692Sならびに三重変異体Q534H、Y673S、V692Sの残余SAは、WT-rhuHGFと比較して3%より低かった。しかしながら、これらの変異体のKdはWT-rhuHGFと有意に異なってはいなかった(第1表)。これらの変異体は、HGFのB鎖内部の突然変異は分裂促進活性を遮断するが、それでも尚これらはHGFレセプターに結合できることを示している。したがって、これらの突然変異体は、レセプター結合に続く活性の点では不完全である。

これらの結果は、B鎖はレセプター結合にとって必要ではないが、成る程基(例えばY673SおよびV692S)はHGFの構造および/または活性にとって決定的であることを示している。活性残基Sによる非活性残基V692の置換は、セリンプロテアーゼにおいて見いだされるように活性部位残基D594に対する新たな水素結合が導入されたならば、構造的トランジションをもたらしたのかも知れない。より小さい残基SによるY673の置換もまた、幾らかの局所的構造変動を導入し得る。これに対して、活性残基Q534を仮想した大きさの別の活性残基D594に置換しても、この残基が露出されるようなHGFコンホメーションの劇的な相違をもたらしうもなく、実質Q534H変異体はrhuHGFと類似であった(第1表)。

実施例5

C末端およびクリングル除去の影響

α鎖がHGF結合または活性にとって必要であるか否かを確認するために、実施例1に記載されるようにC末端切除を行ない、α鎖のみを含む変異体、または第三(N-384)もしくは第二(N-303)クリングルの後で先端切除した

変異体を生成させた。

B鎖を除去または図1に示される逆説する番号のクリングルに加えてB鎖を除去することによって、HGFのC末端切除を複数実施した。第一クリングルを伴うN末端ドノインに相当する一つの変異体(N-207)は、ウェスタンプロティングまたはポリクローナル抗体製造を用いるELISAのいずれによても検出しえるレベルの蛋白を発現せず、したがってこれはこれ以上調べてはいけなかった。HGFの最初の二つのクリングル(N-303)、三つのクリングル(N-384)または完全なα鎖を含む変異体の発現は、250~600ng/mlと低かった。WT-rhuHGFと比較したこれらの変異体の残余SAおよびKdの一覧を第1表に示す。比較された濃度において、バックグラウンドレベルより高い活性は観察されず、この事は、これらの変異体が生物学活性を失っていることを示すものである。しかしながら、結合競合は、変異体N-303、N-384または△鎖が実質的な結合能力を保持している(WT-rhuHGF結合と比較して23%まで)事を示した。したがって、HGFのN末端の272の残基(変異体N-303の近傍)が、HGFレセプターとの高親和性結合にとって充分である。各クリングルドメインの除去の効果を第1表に示す。HGFの第一クリングルの除去(変異体△K1)は生物学活性に最も大きく影響し、少なくとも100倍の低下(SA<wt-rhuHGFの0.2%)を示した。同様に、この変異体の結合もまた、2ng/mlまでは結合についてwt-rhuHGFと競合しないといったような影響を受けた。全ての他のクリングルの除去(変異体△K2、△K3または△K4)もまた、著しく低下した分裂促進活性を説明した(第1表)。しかしながら、これらの除去変異体のKdは、wt-rhuHGFで観察されるそれと近いままであった。

これらのデータは、クリングルK3およびK4はレセプター結合に必要でないことを示している。本発明者等のデータは、アミノ酸配列がHGF/NK2と並んで類似している変異体N-303がHGFレセプターとの結合について有効に結合する能力を保持している(Kd=280pM)という意味において、ミヤダワ等、1991、上記およびチャン等、1991、上記、による先の結果を支持するものである。さらに、N-303はレセプターへの結合にとって充分である

という知見、および第二クリングルはHGFレセプターへの結合に必要ない(該分子の残部という状況において)という知見は、レセプター結合ドメインがhuHGFのフィンガーや第一クリングル内に含まれるということを示唆する。遺憾なく本発明者等はこの変異体の発現を本発明者等のポリクローナル抗体を用いて検出することができなかつたが、これは、その変異体N-207(第一クリングルの後の除去)が293細胞で表現されないことを示唆している。

実施例6

ヒトHGFレセプターのチロシンホスホリル化の説明

本発明者等は、HGFレセプターにインピトロで結合するが分裂促進活性については不完全な変異体R494EまたはY673S、V692Sが、A549細胞においてHGFレセプターのチロシンホスホリル化を誘導するかどうかを決定した。血清凝固阻害を、修飾されたWT-rhuHGFまたは変異体で処理し、HGFレセプターの免疫沈降物をホスホチロシン抗体でプローティングおよびプロービングした。wt-rhuHGFによる割合は、HGFレセプターの145kDaサブユニットのチロシンのホスホリル化を導いた(図4)。いずれの変異体も、HGFレセプターのホスホリル化を誘導する低下した能力を喪失した。

HGFによるHGFレセプターβ-サブユニットに対するチロシンホスホリル化の割合はかつて報告された【バッターロ等、Science. 251巻802~804頁(1991)、ナルディニ等、1991、上記】。本明細書中のデータは、変異体R494EおよびY673S、V692Sは可溶性HGFレセプターを結合させることができが、1gG蛋白はインピトロでA549細胞におけるチロシンホスホリル化の割合には有効でないことを示している。この結果の一つの解釈は、これらの変異体はA549細胞上のHGFレセプターを結合させることはできるが、有効なホスホリル化の頻度に必要な機能、例えばレセプターの二量体化という点では不完全であるという事である。上皮および血小板由来の成長因子のような、内因性チロシンキナーゼを有する他のレセプター蛋白について、キナーゼ機能の活性化にはレセプター-レセプター相互作用または二量体化が必要であることが示されている【経緯についてはウルリッヒおよびシェレジンガ、Cell. 61巻203~212頁(1990)を参照されたい】。もう

ではなく、これらの変異体は、四面一表面付属HGFレセプターを結合させることができないのかも知れない。

HGFの特異な構造は、この分子の生物学活性を調節する複数の事象があり得ることを示唆している。調節の初期段階は、生物学的に活性な二本鎖型を生成するための開鎖工程であろう。開鎖早いことに、開鎖は、単にレセプター結合を調節するのではなく、HGFレセプターの活性化に要するその後の事象を調節しているかも知れない。本発明各々のデータはさらに、レセプター結合にとって絶対に必要である訳ではないが、レセプター活性化工程に寄与していることを示唆している。これらの変異体は、HGFレセプターにおける例となる事象の分析に有用であり得る。

実施例7

ヘアビンドメインおよびクリングル1ドメイン変異体

第2表および第3表に示される**huHGF**変異体を作成し、それらの特異活性(SA)およびKd比を前記実施例の記載と本質上同様にして測定した。

上の記載は例の好ましい態様についてのものであるが、本発明はこれらに限定されないことが理解できるであろう。本発明の総合的概念を逸脱することなく、開示される態様に様々な修改が施され得ることが當業者には考へられるであろう。このような態様は全て本発明の範囲内にあることが想図される。

表1

変異体(var)	SAvar/SAvt	Kdav/Kdvt
一本鎖	\pm -S.D.	\pm -S.D.
R494I	<0.03	0.32 \pm -0.18
R49D	<0.03	0.51 \pm -0.21
R49E	<0.02	0.31 \pm -0.13
プロテアーゼ		
GS34I	1.19 \pm -0.44	1.43 \pm -0.85
Y672S	0.27 \pm -0.07*	1.35 \pm -0.72
Y692S	0.03 \pm -0.04	1.02 \pm -0.13
Q534L Y573S	<0.03	2.24 \pm -1.11
Y672S, Y692S	<0.02	1.76 \pm -0.63
Q534L Y573S, Y692S	<0.02	1.91 \pm -1.28
C末端切端		
K-303	<0.05	0.23 \pm -0.03
K-384	<0.05	0.25 \pm -0.02
α組	<0.04	0.25 \pm -0.03
クリングル除去		
△X1	<0.002	0.03
△X2	<0.05	0.41 \pm -0.18
△X3	<0.03	0.55 \pm -0.35
△X4	<0.07	0.85 \pm -0.46

*は、変異体の分離促進活性が野生型**huHGF**と同じ絶対レベルに至らなかつたことを意味する。

表2

HGF変異体	n	SA mut/vt \pm SD	n	Kdmut/mut
wt rhHuHGF	3	1	3	1
X137A	3	1.12 \pm -0.10	3	0.98 \pm -0.04
X144A, X148A	3	0.93 \pm -0.16	3	1.03 \pm -0.08
E159A	3	<0.02	3	<0.03
S161A	3	0.15 \pm -0.03*	2	0.05 \pm -0.04
P162A, L163A, S165A, S166A	3	<0.02	3	0.05 \pm -0.02
F162A	3	0.04 \pm 1.0.01*	3	0.05 \pm -0.01
L163A, S165A, S166A	3	0.14 \pm -0.08	3	1.10 \pm -0.04
Y167A	3	1.22 \pm -0.22*	3	0.82 \pm -0.05
Y167F	3	0.38 \pm -0.03*	3	1.07 \pm -0.02
Y167S-Y167A	3	<0.02	3	<0.02
Y167S-Y167F	3	0.11 \pm -0.02	3	1.01 \pm -0.13
X168A	3	0.83 \pm -0.07	3	0.68 \pm -0.04
Q173A, E174A, N175A	3	0.33 \pm -0.07*	3	0.21 \pm -0.02
Q173A	3	0.13 \pm -0.03*	3	0.15 \pm -0.05
E174A	3	0.84 \pm -0.11	3	0.99 \pm -0.02
E181A, E183A, E184A	3	0.92 \pm -0.08	3	0.95 \pm -0.04
N193A, E195A, R197A	3	<0.02	3	<0.04
S193A	3	0.45 \pm -0.12	3	0.62 \pm -0.20
R195A	3	0.10 \pm -0.06	3	0.17 \pm -0.05
R197A	3	<0.01	3	<0.03
Y198A	3	0.88 \pm -0.08	2	0.77

*は、変異体の分離促進活性が野生型**huHGF**と同じ絶対レベルに至らなかつたことを意味する。

表3

HGF変異体	n	SA \pm mut/vt	n	Kd vt/mut
wt rhHuHGF	3	1	3	1
Y ⁺ 44-A7 ⁺ 7	3	<0.01	3	<0.02
E34A, E35A, R264	3	0.71 \pm -0.33	3	0.95 \pm -0.03
E52A, D54A	3	0.32 \pm -0.03*	3	0.95 \pm -0.03
E52A	3	0.15 \pm -0.03	3	0.85 \pm -0.05
D54A	3	0.13 \pm -0.01	3	0.79 \pm -0.10
E58A, E60A, E52A, E53A, N65A	3	0.96 \pm -0.12	3	0.99 \pm -0.07
R72A, R75A, R77A, E78A	3	0.04 \pm -0.07	3	0.03 \pm -0.11
E109A, E110A, E111A	3	0.98 \pm -0.04	3	0.78 \pm -0.02
E114A, E115A, D117A	3	<0.02	3	<0.04
E114A	3	0.16 \pm -0.04*	2	0.59
E115A	3	0.20 \pm -0.03*	2	0.47
D117A	3	0.02*	2	0.14
R126A, R127A	3	0.33 \pm -0.14	3	0.87 \pm -0.12

*は、変異体の分離促進活性が野生型**huHGF**と同じ絶対レベルに至らなかつたことを意味する。

記 列 表

(1) 一般的情報

- (i) 特許出願人：ジェネンテク、インコーポレイテッド
ゴドウスキ、ポール・ジェイ
ロッカー、ナナリー・エイ
マーク、メラニー・アール
(ii) 発明の名称：肝細胞成長因子変異体
(iii) 記載の数：21
(iv) 通路先：
(A) 名元人：ジェネンテク、インコーポレイテッド
(B) 通り：ポイント・サン・ブルーノ・ブルーバード450番
(C) 市：サウス・サン・フランシスコ
(D) 州：カリフォルニア
(E) 国：アメリカ合衆国
(F) ZIP：94080
(v) コンピューター解読書式
(A) 録体型：5.25インチ、360Kbフロッピーディスク
(B) コンピューター：IBM PC互換
(C) オペレーティング・システム：PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウエア：Patin (ジェネンテク)
(vi) 本出願のデータ：
(A) 出願番号：
(B) 出願日：
(C) 分類：
(vii) 優先権主張出願のデータ：
(A) 出願番号：07/884811
(B) 出願日：1992年5月18日

(viii) 優先権主張出願のデータ：

- (A) 出願番号：07/885971
(B) 出願日：1992年5月18日
(ix) 共理士／代理人情報
(A) 氏名：ドレジャー、ジンジャー・アール
(B) 登録番号：33.055
(C) 参照／監理番号：755.779P1
(x) 電話連絡先情報：
(A) 電話番号：415/225-8216
(B) ファックス番号：415/952-9881
(C) テレックス：910/371-7168

(2) 記載番号1の情報：

- (i) 記載の特徴
(A) 長さ：4732
(B) 型：核酸
(C) 頃の数：一本鎖
(D) トポロジー：立体状

(xi) 記載：記載番号1：

TTCGAGCTCG CGCGCATCTG ATTATTCGAT ACTTATTAAAT AGTAACTAAT 50
TACGGGTTCA TTACTTCATA GCGCATATAT CGCTTCGCCG GTTACATAAC 100
TTACCGTAAA TGCCCCCGCTT CGCTGACGCC CGAACGACCC CGCGCGATTC 150
ACGTCATAAA TGCGCTATGT TCCATAGTA AGCGCAATAC GGACTTCCA 200
TTGAGCTCAA TGGTGGAGT ATTAAAGGTA AACTGGCGC TTGGCACTAC 250
ATCAAGCTGA TCATATGCCA AGTACCGCCC CTTTGAGGT CAATGACGT 300
AAATGGGGCG CCTTGCGATTA TCGCCGACTAC ATGGCGTTAT GGGACCTTCC 350

TACCTGGCAC TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTTATTACG ATGGTGATGC 400
GGTTTTGGCA GTACATCAAT CGCGCTGAGT AGCGGTTGCA CTCAACCGGA 450
TTTCGAGTC TCCACCCCGAT TGACCTCAAT CGCGAGTTGT TTTTGCAACCA 500
AAATCAACGG GACITTCACAA AATTCGCTAA CAACTCCGC CGATTGACCC 550
AAATGGGGCG TACGGCTGTA CGGTGGGAGG TCTATATAAC CAGAGCTCGT 600
TTAGTGACCC GTCAAGATCC CGTGGAGACG CATCACACGT GTTTCGACT 650
CCATAGAACA CACCGGGACC GATECAGCGT CGCCCGGCGG GAACCGCTCA 700
TTGCAACCCG GATTGGCGT CGCAAGAGTC AGCTTAAGTAC CGCTTATAGA 750
GTCTTATAGGC CGACCCCGTT GCCTTCCGTA GAAGCGCGCT ACATAATTATA 800
CATACCTTA TGTATTCATAC ACATACCCATT TAGCTGACAC TATAGAATAA 850
CATCACCTT CGCTTCTCTC CGACAGGTG CGACTCCCG CGCCAACCTC 900
ACCTGGGTC TATCGATTGA ATTCCCGGG GATCCCTCTAG ATCTGACCTG 950
CAGAAGCTTC CGCTCGACCA AGCTTGGGCC CGATGGCCCA ACTTGTCTAT 1000
TGCACCTTAT AATGCTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA 1050
ATAAACCGTT TTTCCTACTG CATTCTAGTT GTGGTCTCTC CAACACTCATE 1100
AATG7ATCTT ATCATGTCCTG GATEGATCGG GAATTAATTC GCGCCAGCAC 1150
CATCCCGCTCA AATAACCTCTA GAAAGAGGAA CTGGTGTAGG TACCTCTGA 1200
GGCGGAAGA ACCAGCTGTC GAATGCTGTG CAGTGTGGGT GTCCGAAAGTC 1250
CGACGGCTCC CGACGAGGCA GAAGTATGCCA AAGCATCCTG CTCAATTAGT 1300
CGACCAACCG AGTGTGGAAAG TCGCCAGGT CGCGAGCGG CAGAAGTAGT 1350

CGAACGATCC ATCTCAATTG GTCAACCAACG ATAGTGCGC CGCTAACCTCC 1400
CGCCATCGG CGCGTAACTC CGCGCGCTTC CGCGCATCTC CGCGCGATTC 1450
GCTGACTAAAT TTTCCTTATT TATCGAGAGG CGAGGCGCGC CTGCGCGCTC 1500
GAGCTTACG CGAAGCTAGC AGGAGCGTTT TTGCGACCC TAGGTTTTCG 1550
CAAAAGCTG TTAAACGCTT CGACCTGGCG CGTGTGTTACG AAAGTGTGTA 1600
CTGGGAAACG OCTGGCGTTA CGCAACCTAA TCGCTTCCA CGAACGACCC 1650
CCTTCGGCG CGTGGCGTAAT CGCGAAGAGG CGCGCGACCG CGCGCGCTCC 1700
CAACAGCTCC GTACCGTGA TGCGGAATCG CGCGCATCTC GTTATTTTCG 1750
CTTACCGAT CGTGGCGTAA TTTACACCGG CATACTCTAA CGAACGACATA 1800
GTACCCGCCG TGTAACGCCG CATTAAAGCCG CGCGCGCTTG GTGGTTCGCC 1850
CGAGCTGTCAC CGCTACACTT CGCAGGCGCC TAGCGCGCGC CGTGTGCTG 1900
TCTCTCCCTT CTGTTCTCC CGCGCTGCCG CGCTTCCGC CGTACGCTC 1950
AAATCCGGG CGCGCTTATG GTTGGCGATT TACTGCTTAA CGCGCGCTG 2000
ACCCCAAAA ACTTGATTTG GTGCGATGGT CGCGTGTGGT CGCGATCPCC 2050
TGATAGCGG TTTTCGCGG TTTCGCGCTG GACGCGACTG TCTTAAATAG 2100
TGGACTCTG TTCCAAACTG CGACACACTG CGACCGTTCG CGCGCGCTCC 2150
CTTTCGATT AATAGGGATT TTGCGGATTG CGCGCTTATG GTTAAAGAAAT 2200
GAGCTGATTG CGACACAAATT TAACCGGAAAT TTAAACAAA TATTAACGTT 2250
TACAATTGTA TGGTGGACTC TGAGTAAAT CTGCTCTGAT CGCGATAGT 2300
TAAGCGACT CGCGTATCGC TACGTGACTG CGTCATCGT CGCGCGCGAC 2350
ACCGCCCAAC CGCGCGTGCAC CGCGCGCTGAC CGCGCGCTCTC CGTCCCGCGA 2400

TCCCTTACA GACAACTGTG CACCGCTCAG GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG 2450
 GTTTTACCC TCACTACCGA AACCCCCGAG GCAGTATTCT TGAGACCAA 2500
 AGGGCTCTGT GATAACGCTA TTTCATAGG TTAACTGCAT GATAATAAG 2550
 GTTCTTACA CGTCAGCTGG CACTTTCTG GGAATGTCG GCGGAACCCC 2600
 TATTTCTTA TTTCCTAAA TACATTCMAA TATGTATGCC CTCTAGACAC 2650
 AATAACCTG ATTAATCCTT CAATAATTGAA GAAAGGAA GAGTATGACT 2700
 ATTCAACATT TCGTGTGCG CCTTATTCCTC TTTCCTGGCG CATTTCCTC 2750
 TCCGTGTTT OCTCACCCAG AAACGCTCTG GAAAGTAAA GATGCTGAG 2800
 ATCACTGGG TCGACAGTG GTTACATCG AACTGATCT CAACACGGT 2850
 AAGATCTTCA AGACTTTCG CCDDGAGAA CCTTTCCAA TGATGAGCAC 2900
 TTITAAGCTT CTCTATGTC CGCGGTTT ATCCCGTAT GACCGCGGC 2950
 AAGACAACT CGTCGGCCG ATCACATT CTCAAGATCA CTGTTGAG 3000
 TACTCAACG TCACAGAAA CCTCTTACG GATOCATGA CAGTAAGAGA 3050
 ATTATGAGT CCTGCCATAA CCTGAGTGA TAACACTGGG CCTAACCTAC 3100
 TTCTGACAC GATGGAGGA CGGAAGGAGC TAACCGCTT TTCTGACAC 3150
 ATGGGGGATC ATGTAACCTG CCTTGTGAGT TGGAACCGG AGCTGAATGA 3200
 AGCCATACCA AAGGAGGAGC GTGACACCAAC GATGCCAGCA GCAATGGAA 3250
 CAACGTTGGG CAACATTA ACTGGGAAAC TACTTACTCT AGCTTGGGG 3300
 CAACAAATAA TACHTGGAT CGAGGGGGAT AACATGCGG GACCACTCT 3350
 GGGCTGGGC CTTCGGCTG OCTGTTTAT TCGTGTATAA TCTGGAGGG 3400
 GIGAGGGTGC CTCTGGGGT ATCATTCAG CACTGGGCC AGATGCTAAG 3450
 CCTCTGGCTA TGTAGCTTAT CCTACAGGAGG CAACTATGCA 3500
 TCAAGGAGT AGACAGATGCTG CTAGATGAGG TGCTGACTCT ATTAAACATT 3550
 CCTTACGCTG AGACAGATGTT TACTCTATA TACCTTGTAG TGATTTAAA 3600
 CTCTATTTT ATTTAAAGC GATCTAGTC AGAGTCTT TCTGATAATCT 3650
 CATGACCAA ATCCCTAAC CTGAGTTTC CTGCTACTGA GCGTCAAGAC 3700
 CCTGAGAA GATCAAAAGA TCTCTTGTAG ATCTTCTTCT TCTGGGGCTA 3750
 ATCTGCTCTG TCAACACAA AAMACACCG CTACACCGG TGGTTGTTT 3800
 CGGGATCA GACCTGAGCA CCTTCTTCTG GAGGTTACT GCGTCTAGCA 3850
 GACCGAGAT ACCAACTACT GTCCTCTTG TGATGGCTA GTTACGCCAC 3900
 CACTTCAGA ACTCTGAGC ADDOCTACA TACCTCTCTG TCTTAATCT 3950
 CTTCACACT CCTCTCTCCA CTGCGATATA GTGCTGCTT ACCGGGTTGG 4000
 ACTCAAGAG ATAGTAACTG GATAACGGG AGGGGTTGGG CTGAAAGGGG 4050
 GGTTCGCA CACAGGGAGC CTGAGGGCA AGCAACTACA CGCAACTGAG 4100
 ATACCTACG CGTCGACATT GACAAACCC CACCTTCCC GAAAGGAGAA 4150
 AGGGGACAG CTATGGGATC AGGGGAGGG TGGAAACGG AGAGGCGACG 4200
 AGCGGCCTC CAGGGGAAA CCTCTGGTAT CTCTATGTC CTGCTGGGGT 4250
 TCGGACCTC TGACTTGAGC GTGCTGTTT GTGATGCTG TCAAGGGGGC 4300
 CGACGCTATG GAAACACCC ACCAACACCG CCTTTTAAAG CTGCTGCGC 4350
 TTTCCTGOC CTTCCTCTCA CACTCTCTT CCTGCTTAT CCTCTGATTC 4400
 TUTGGATAAC CCTTAAACG CCTTTCAGTG AGCTGATAAC CCTGGGGGCA 4450

CGGAACGAC CGACGGCAGC GAGTCAGTGA CGGAGGAAGC CGAAGACCCC 4500
 CGAAATCCCA AACGGCTCTT CGGGGGCTG TCGGGGATTC ATTATCCAG 4550
 CTGGACCGAC AGGTTTCCG ACTGGAACG CGGCACTGAC CGCAACCCAA 4600
 TTAATGTCAG TTAACCTACT CATTAGCAC CGGAGCTTT ACACCTTATG 4650
 CTTCGGCTC CTATGTTGCG TGGAAATGTC AGGGATAAC AATTTCACAC 4700
 AGGAACACC TATGACCATG ATTACGAAAT AA 4752

(2) 配列番号2の情報:

- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 26
 (B) 型: 構成
 (C) 線の数: 一本線
 (D) トポロジー: 直鎖状
- (xi) 配列: 配列番号2:

TTGGAAATCC ATTACAAAC TOGATTTGTT TGTTTGGC ACAAGAT 47

(2) 配列番号3の情報:

- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 30
 (B) 型: 構成
 (C) 線の数: 一本線
 (D) トポロジー: 直鎖状
- (xi) 配列: 配列番号3:

GAATCCATT TACCACTTCC ATTGTTTCC 30

(2) 配列番号4の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 26
 (B) 型: 構成
 (C) 線の数: 一本線
 (D) トポロジー: 直鎖状
- (xi) 配列: 配列番号4:

CCATTTACA ACTGCAATT GTTGG 26

(2) 配列番号5の情報:

- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 22
 (B) 型: 構成
 (C) 線の数: 一本線
 (D) トポロジー: 直鎖状
- (xi) 配列: 配列番号5:

AGAAGGAAA CAGTGTGAG CA 22

(2) 配列番号6の情報:

- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 22
 (B) 型: 構成
 (C) 線の数: 一本線
 (D) トポロジー: 直鎖状
- (xi) 配列: 配列番号6:

AGGGGGCAC CAGAAATCCCC CT 22

(2) 配列番号7の情報:

- (1) 配列の特徴

(A) 長さ: 23

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 7 :

TCCACCAACC CGAGAAATCA CAC 23

(2) 配列番号 8 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 30

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 8 :

GCATTCAACT TCTGAGTTTC TAATGTAGTC 30

(2) 配列番号 9 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 30

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 9 :

CATACTATTC TCACCTCAA CTTCATCAAC 30

(2) 配列番号 10 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 30

(C) 線の数: 一本線
(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 13 :

TTGTOCATGT GATTAATCAC AGT 23

(2) 配列番号 14 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 35

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 14 :

GTTGGTTC GGATOCATT TACCTATGCC AACATTG 35

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 10 :

TOCATGTCAC ATATCTCTAG TTCTTTCTAA 30

(2) 配列番号 11 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 30

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 11 :

TCTGCTATCA CCTTCATCTT CTCCATCTGA 30

(2) 配列番号 12 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 24

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 12 :

ACCTTGAGTC CATTAACTTC TTTC 24

(2) 配列番号 13 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 23

(B) 型: 直線

(2) 配列番号 15 の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 10596

(B) 型: 直線

(C) 線の数: 一本線

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号 15 :

TTCCAGCTCG CGCGACATTC ATTATTGACT ACTTATAAT ACTAATCAAT 50

TACCGGGTCA TTACTTCATA CCCTCATATAA CGAGTTGCC CTTCACATAC 100

TTACCGTAA TGCGCGCGT GGCTGACCCC OCAACCGACCC CGCGCGATTC 150

ACCTCAATAA TGACGTATGT TCCATAGTA ACCTCAATAAG CGACTTTCGA 200

TTGACGCTAA TGGCTGGAGT ATTACGCTTA AACCTGGACAC TGGCGACTAC 250

ATCAAGCTA TCATATGCC ACTACGGCCC CTATTGAGCT CAATGACGGT 300

AAATGGCGCG CCTGGCACTTA TGGCCAGTC ATGACCTTAT CGGACTTTCG 350

TACTTGCGAC TACATCTAAC TATTAGTCAT CCCTTAACTC ATGGTGATCC 400

GGTTTGGCA GTACATCAAT CGCGCTGGATG AGCGGTTTGA CTCAACGGCA 450

TTTCGAATTC TGACACCAT TGACCTCAAT CGGAGTTTGT TTGGCCACCA 500

AAATCAACCC GACTTTCATAA ATCTGCTCAA CAACTCGCCC CGATGACCC 550

AAATGGCGG TAGGGCTGTAA CGCTGGCGACG TCTATATAAG CAGAGCTCGT 600

TTAGTGACCC GTCAGATGCC CTGGAGACCC CATCCACCTT GTTGTGACT 650

CCATAGAAGA CACCGGGACC CATCCACCTT CGCGCGCGG CGACCGCTCCA 700

TTGGAAACCC GATTCGGCGT CGCCAGACGGT AGCTTAACTAC CGCTTATAGA 750

GCTCTATAGGC CCACCCGTT CGCTTCGTTA GAACGGCGT ACAATTAAATA 800
 CATAACCTTA TGTATCATAAC ACATACGATI TAGTGACAC TATAGAAATA 850
 CATCACTTT GCCTTCTCTC CCACAGGTGT CCACCTCCAC CTGCCACTOC 900
 ACCTCGGTC TATGGATCTC CGAGAATTAA TTCAAGETTC CGGGCGCAGC 950
 TTGGCGCGCA TGCGCGCACT TGTTTATTTC AGCTTATAAT GTTACAAAT 1000
 AAACCAATG CTCACAAAT TTCACAATAA AACCATTTC TTCACTCCAT 1050
 TCTAGTCTC GTTGTGCA ACCTCATCAAT CTATCTTATC ATCTCTGGAT 1100
 CGATGGAA TTAACTGGC CCACCACTC GCGCTGAAT AACCTCTGAA 1150
 AGAGGAACCT GTTGTGTCAC CTTCGAGGC CGAAAGAACC ACCTGTCGA 1200
 TGCTGTGAG TGACGGCTG GAAGTCCC AGCTCCCGA CGAGGCAAA 1250
 CTATCCAAAG CTCACATCTC AATTTAGTAG CAACAGGTC TGGAAGTCC 1300
 CCAGGTCCG CAGGACCCAG AAGTATGCA ACCATACATC TCAATTAGTC 1350
 AGCAACATA GTCCCGCCCG TAATCCCGC CATCCCGC CTAACCTCCG 1400
 CGAGTCCCG CCATCTCGC CCCTATGGT GACTAATTTT TTCTTATTAT 1450
 CGAGGAGCG AGCGCGCTC GGCGCTCTGAG CTATCCAGA ATGAGTGGG 1500
 AGCTTTTTT CGACGGCTAG GTCTTTCGA AAACGCTCTC ACCTGTGAA 1550
 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCCGATAG ATCCCTCACAG CGCGCACCA 1600
 CTCTTCTTC GTTTCGCGCA TGACGATCTC TGCTCTGTA CCTTGAAAGC 1650
 GAAGAGGAGG GTCTCGGAGA ATCCCGATCC CTACCGCTCA CGAAAAAGCG 1700
 CGAGGAGGA TTTCAGGCT GTCTTGAGC TGAGGACCA AATCTTGAGG 1750
 ATGTTCAAGG CGAGTTTTCG GGGCTCCGAG TAATGGTGA TGAGGACCG 1800
 GATCTGGCG GAGGCTCTCTG CGCTCTGGC TGCTCTGGT TGCTCTGG 1850
 GATCTGGCG GAGGCTCTCTG CGCTCTGGC TGCTCTGGT TGCTCTGG 1900
 ATCTCTCTA TCTACCTCTA CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG ATCTCTCTCT 1950
 TTCTCTCTG TGCTCTCTG CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG ATCTCTCTCT 2000
 CGCTCTCTA CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCT 2050
 GAGCTCTCTA CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCTG CGCTCTCTCT 2100
 AGAGGAGCA CGACCGCGAC CACCCAGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2150
 CGCCAGAGCA TAGAGATGTG TGCGGAGAC CGACAAAGCC CGCAAGTCC 2200
 ATTCCTCTA AAAGGAGCA CGCTCTCTA CGCTCTCTG CGACCGCGAC 2250
 AGGGCGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2300
 GAGGGCGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2350
 CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2400
 AGGGCGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2450
 CAGGAGGCG CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2500
 CGGCGACCG CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2550
 AGCAGGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2600
 CAGGAGGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2650
 CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2700
 AGCAGGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2750
 CAGGAGGAGCA CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2800
 CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 2850

ACCAGGAGGG CGACGAGGG CAGGAGGAGG AGGGCGAGGA GGGCGAGGAG 2900
 CAGGAGGAGG CGACGAGGAGA CGAGGCGAGG GAGCAGGAGG TGAGGCCCG 2950
 CGTGCAGGAG CGACTGGGTCG CGCGGGCTCGA GGACGTAGTG GGGCGGGGG 3000
 TCCAGGAGGT AGTGGAGGCC CGCGGGCTAG AGGACGCTGA AGACCGACCG 3050
 CGGGAAGTCC TGAAGAGGCC AGGGGGACAG CTGGCTGAGC TGGAGAAAAG 3100
 ACCGGCGAGG CGTCCAGTAG TGAGTCATCA TCATCCGGT CTGGACCCCG 3150
 CAGGCGCCCT CGAGGTGAGA CGCCATTTC CCACCGCTGA CGGGGAAGGGC 3200
 ATTATTTTCA ATACCAACCA GAAGGTGGCC CAGATGGTGA CGCTGACCTG 3250
 CGGGGGGGAG CGATGACCA CGGGGGGGCGA GATGACCCAG GAGAAGGCC 3300
 AAGCACTGGA CGGGGGGGTC ACGGTGATGG AGGGAGGCC AAAAAAGGAG 3350
 GGTTGTTTCG AAACGATGGT GTCTCAAGGG CGTCCAAACCG CGAATTTGAG 3400
 AACATGGAG AGCTCTCTC CGCTGGACTC ACCTGAGAAAG 3450
 GACTACCGAC GAAGGAGCT CGGTCCCGCG TGCTCTCTCA TATGGAGGTA 3500
 GTAAAGACCT CCTTCAAC CTAACCGCGA GAACGCGCT CGCTCTTCA 3550
 CAATGCGTC TTACACATT GACTGGCTCTC CGCTCTGGAA TGCCCCCTGG 3600
 ACCCGGCGCA CAACCTGGCC CGCTAAGGGG CGCTCTCTC CGCTCTTCA 3650
 TGGCTTTTTT ACAAACTAT ATATTCGTC AGCTTCTGAA CGATCCGATT 3700
 AGGGACCTG TTATGACAA CGCGCTCTC ACCTGCAATA TCAGGGTGAC 3750
 TGCTGCGAG CGTGGACCTG GAGTAGATTG CGCTCTCTG TTTCACCTA 3800
 TGCTGCGAG CGTGGACCTG GAGGGTGAC CGAGGAGATCA CGGAGATGAA 3850
 CGACCTGATG GAGATGACCC TGAGGAAGGG CAGGAGCTAT CTAACTCTT 3900
 AGGAGGAGGG CGACGAGGG CAGGAGGAGG AGGGCGAGGA GGGCGAGGAG 3950
 CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC CGACCGCGAC 4000
 CTGCTCTGTC ACCATTTCTG TGCTCTCTA CGCTCTCTG ATGGGCAAT TGCGCATAC 4050
 CATCTCTCTA CGTCACTCTG CTGCGCGTC AACGCTCTC CGCTCTCTG ATGGGCAAT 4100
 AACATTACCC ACATTTACCT CGTCACCAAT CAGACATCCG ACCTGTTTCG 4150
 CCTGGCTCC TTAACTCTAC CTGACATGG CGACCAACCG CATGCGGAA 4200
 AAGGACAAAGC AGGAAAGAATT CACGGGGCTC TGCGGAGTGC CGCCATATCC 4250
 AAAGGATACG ACTCCACCTC TACTACTCC TATCATATCC TGACTGTATA 4300
 TGCTGAGGA TACCATATCC TACCCGATA CAGTTAGGA TACCATATAC 4350
 TACCCGATA TAGATTAGGA TACCATATCC TACCCGATA TAGATTAGGA 4400
 TACCCGATA TACCCGATA TAAATTAGGA TACCATATAC TACCCGATA 4450
 TACATTAGGA TACCATATCC TACCCGATA TAGTTAGGA TACCATATCC 4500
 TACCCGATA TAGATTAGGA TACCATATCC TACCCGATA TAGATTAGGA 4550
 TACCATATCC TACCCGATA TTGGGTTAGT ATATGCTACG CAGATATAAA 4600
 TTACGATACG ATATGCTACG CTAACTCTCA TTACGATACG ATATGCTACG 4650
 CGGACATAGA TTACGATACG ATATGCTACG CAGATATAAA TTACGATAGC 4700
 ATATGCTACG CAGATATAAA TTACGATACG CTAACTCTCA CAGATATAAA 4750
 TTACGATAGC ATATGCTACG CAGATATAAA TTACGATACG ATATGCTACG 4800
 CAGATATAAA TTACGATACG CTAACTCTCA CAGATATAAA TTACGATACG 4850
 ATATGCTACG CAGATATAAA TTACGATACG CAGATATAAA TTACGATACG 4900
 CGACCGCGAC CGCTCAGGAGC CTGCTGAAATA TGAGGACCAA CGACCGCGAC 4950

CTTGGCGCTC AGGGGAAAGT CTGTGTAATG TGCTCTCGAG ATGCCAGGAA 5000
 TCGGGGCGCTC ATCTTGCGC CGCCACCTAC TTACCGGTG ATTCGGGGG 5050
 GTGCCATTAG TGCTTTCCTG CGCAAGCTGT TTACCGCGAG TGCTTAGCGG 5100
 GGTACAAATC AGCCAACTTA TTACGGCTT ATTTCAGCT CAAACAGGC 5150
 AGGGGGCGCTC GTDGGGGCTG ACGGGTGGCC CGACTCACA ATTCAAAA 5200
 AAAGACTGCC CACTTGTCTT TGTTTATGGC CGCCATGGC GTGAGGCGG 5250
 GTTAAATTCTT CGGGGGTGT AGAGACAAAC AGTGGAGTGC GTCTGGTGTG 5300
 CGCTCCACTC TCCTTCCCTG TGTTACAAAT AGGTGTAAC AACATGGTC 5350
 ACCTCTCTTG GTCTCTGGT CGGACACATC TTAAATAACC CAGTATCATA 5400
 TGGACTAGG ATTATGTGTG CGCCATGCC ATAAATTGGT GTGAGATOGA 5450
 CATCCAGTCT TTACCGCTTG TCCCAACCC ATGGATTTCT ATTCTTAAG 5500
 ATATTCAGAA TGTTTCTTC TGACACTAGT ATTATTCGC CAAAGGTTT 5550
 GTGAGGTTA TATGGCTTC ATACCAAACT CGCACCAGTC AACCCCCCT 5600
 CCAAATTTA TTCTGGGGC GTCACTGAA ACCTTGTGTT CGAGGACCTC 5650
 ACATACCTI TACTCTTCAC AACTCAGAG TTATTCATA AGCTAAAGA 5700
 AGGAGATGA AGAACCGGC GAAGATTCAAG GAGGTTCACT CGGGGGCTC 5750
 TTGATCTTEA CGCACTGCC TGTTGACTAA ATGGTTCACT TACCTCTG 5800
 GAATCTTGAC CGCATGAA TAAACCTG ACAGCTTCACT CGCTGGAGA 5850
 TATGGCTGT CGTAGGACC CTTTTACTAA CCTTAATTGG ATACATATG 5900
 CTTCGGTGTG GTTAACATAT CCTATTGAT AGGGTTAGT CTGGATAGA 5950
 TATACTACTA CGGGGAAAGC ATATGCTAAC CGTTTGGGT TAACAAGGG 6000

 GCGAGGCGCA ACCTTTCATA GAAGGGCGCG GTGGAAATOGA ATCTGGTGA 7100
 TCGAGGTTG CGGGTGGCTT GTGGGGTCACT TTCAAAACCC AGACTGGCCC 7150
 TCAGAGAACAC TTCTCAAGA CGGGATAGAA CGGTAGGCGC TCGAAATCG 7200
 GAGGGGGCAT ACCTGAAAGC AGGAGGAAGC GTTCAGGCCA TTCCGGGCCA 7250
 AGCTCTTCAG CAATATCACG GTAGGCCAAC CCTATGTCCT GATAGGGTC 7300
 CGCCACACCG AGGGGGCGAC AGTCATGAA TCAAGAAAG CGGGGATTTC 7350
 CGACCATGAT ATTGGCGCAAG CAGGCATGCC CTCGGTCACT GAGGAGATCC 7400
 TCCCTCTGG CGATCCCGC CTGAGGCTC CGGAACACTT CGGCTGGCC 7450
 GAGGCTCTGA TGCTCTCTGT CGACATCATC CTGATGGACA AGACGGTT 7500
 CCATCGAGT AGCTGGCTCC TCGATGGAT GTTTCGCTTG GTGGTGGAT 7550
 CGGGGGCTAC CGGATCAAG CCTATGCCAC CGGGGATTG CATCACCCAT 7600
 GATGGAACTT TTCTGGCGA GAGCAAGGG AGATCACCG AGATCTGCC 7650
 CGGGGACTTC CGGCAATAGC AGGAGTGGC TTCCGGCTTC AGTCACAAAC 7700
 TCGAGGACAG CTGGCCAGG AACCCCGCTC GTGGCGACCC AGGATACCG 7750
 CGCTGGCTCG TCGTCACTG CATTGGGCC AGGGCACAGG TCGCTTGA 7800
 CAAAGAACAC CGGGGGCGGC CGGCTGACA CGGGGAACAC CGGGGCGATCA 7850
 GAGGAGGCCA TTCTCTCTG TCCCGACTCA TAGGCCATA CGCTCTCCAC 7900
 CGAACGGGCC CGAGAACCTG CGTGGAAATCC ATCTTGTCA ATCACTGAA 7950
 AGGATCTCA CTCTGTCCT TGATGAGTC TCGGGCACCG TGTTGACCT 8000
 GTTAAGGGGG TCGCTCGAGG GTGGCTCCCT GTTCGAGGCC ACACGGTCA 8050
 CCTTAATATG CGAACTGAGC CTGGGACCC CGGGGGCGGA CTGCACTGTC 8100

 GCTCTGGAAT TCATCAAAGC AMCCATAGTA CGCCCGCTG AGGGGGCAT 8150
 TAAGGGCGCG CGGGTGGCTG GTTACCGCGA CGGTGGCGC TACACTTGGC 8200
 AGGGGGCTAG CGCCCGCTGC TTTCGCTTC TTGGGGTCTG TCTGGCGAC 8250
 GTTGGGGCGC TTTCGGGCTC AAAGCTTAAAG TCGGGGGCTC CCTTGTGGT 8300
 TOGATTTAG TGCTTTCAGG CGCTGGACCG OCAMAAAGCT TGTTGGGT 8350
 GATGGTTCACT GTAGGGGGCC ATGGGGCTGA TAGAGGTTT TCGGGGTT 8400
 GACCTGGAG CGACCTTCTT TTAAATGAG ACTCTGTCCT CAACCTGGAA 8450
 CAACACTCA CGGATCTCG CGCTTCTCTT TTGATTTATA AGGGATTTG 8500
 CGGATTTGG CGTATGGTTT AAAAATGAG CTGATTTAC AAAAATTTAA 8550
 CGGGAAATTTT AACAAATAT TAACGTTAC AATTTTATGG TCCAGGCC 8600
 GTGATAACCG TATTTTATA CGGTTAATGCA ATGATAATAA TCGTTCTTA 8650
 GACCTCACTG CGGACTTTC CGGGGAAATGT CGGGGGACCG CCTTGTGGT 8700
 TATTTTCTA AACATCTCA AATATGATC CGCTCATGAG ACAATAACCC 8750
 TGATAAAATCC TTCAATAATA TTGAAAAGG AACAGTATGA GTATCAACA 8800
 TTTCGGTGTG CGCTTCTTC CCTTGTGGTCC CGGATTTGCG CCTGCTGTT 8850
 TTGGCTCAACG AGAAACCTG GTGAAAAGTA AGAGATGAG AGATGAGTG 8900
 GTGGCACCG AGGAGTGGAT CGGACTGGAT CTCAACAGCG GTAGAGTGGT 8950
 TGAGAGTTT CGGGGGAAAG AACGGTTTCC AGTGGATGCC ACTTTTAAAG 9000
 TTCTCTCTG TCGGGGGGTA TTACGGCTG ATGAGGGGG CGAAGGGCA 9050
 CTGGGCTCC CGATACACTA TTCTCAGAAAT GACTTGGTC ACTACTCACC 9100
 AGTCACACAA AACATCTTA CGGATGGCGAT CGACATAGA GAATTATGCA 9150

特表平7-506420 (20)

GTGCTTCCAT AACCATGAGT GATAAACATG CGCGCAACTG ACTTCGTGACA 9200
 ACCATGGAG CACCGAAGGA OCTAACCGCT TTTTCCACA ACATGGGOGA 9250
 TCACTTAACG CGCCCTGATC GTTGGGAACC GGAACTGAAAT GAAGCAGTAC 9300
 CAAACGAGGA CGGTGACAC ACCATGCCAG CAGCAATGCC AACAAAGTTG 9350
 CGCAAACTAT TAACCTGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCG CGCAAAATT 9400
 ATAGACACTG ATGGGCGGC ATAAAGCTTC AGGACACTT CTGGCGCTGG 9450
 CCTTTCGGCC TGCGTGGTT ATTCTGATAA ATCTGGGCC CGGTGAGGT 9500
 CGCTCTCGCG CTATCATTGC AGGACTGGGG CGACATGCTA AGCCCTCCCC 9550
 TATCGTAGTT ATCTCACCGA CGGGAGTCA CGCAAACTAT GATCAACCAA 9600
 ATAGACAGAT CGCTCACATA CGTGGCTCAC TGATTAACCA TTGCTTAATG 9650
 TCAAGACCAAG TTAACTCTATA TATACTTATG ATTGATTTAA AACTTCATT 9700
 TTAAATTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCTT TTTCGATAAT CTCTGACCA 9750
 AAATCCCTTA AGCTGAGTTG TGTTCGACT GACCTTCAGA CGCGCTGAGA 9800
 AACATCAAAG CATCTTCTTG AGATCCCTTT TTTCCTGGGG TAACTCTCTG 9850
 CTTCACAAAC AAAAACACCG CGCTTACACG CGTGGTTTGT TTCCCGGATC 9900
 AAGAGCTTACCC AACTCTTTT CCGAAGCTAA CTGCGCTTCAG CAGACCGAG 9950
 ATACCAAATA CTGCTCTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA 10000
 GAACTCTGTA CGACCGCTTA CATACTCCG TCTGCTTAATC CTGTTACCG 10050
 TGCGCTCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTCG TTACCGGTT CGACCTCAAGA 10100
 CGATAGTTAC CGGATAAGGC CGAGGGTCC CGCTGAACCG CGGTTCTG 10150
 CACCAACCCC AGCTTGGCC GAACGACCTA CACCGAACTG AGATAACCTAC 10200

AGCGTGGCA TTGAGALAGC CGCACCTTC CGCGACGGAG AACGCGAC 10250
 AGGTATCGG TAAGCGGAG CGTGGGAGCA CGACGACCGA CGACGAGCT 10300
 TCGAGGGGA AACGCGCTGG ATCTTATGATG TCTCTCGG TTTCGCGGCC 10350
 TCTGACTTGA CGCTGAAATT TTCTGAACTG CGTCGCGG CGCGAGGCTA 10400
 TCGAAAGAAC CGACGCTGCA CGACGAGCTT CGCGAGCTGA AACCGCGGAG 10450
 TGCGCGAC CGCAATTATG TGCTGTTCTC CACTCATTG CGACCGCAGG 10500
 CTTCACACTT TATCTCTGG CGCTGAACTG TTCTGGAATG TGCGAGGCA 10550
 TAACAAATTG ACACAGGAA CGCTGATGAC CACGTTAACG AATTAAC 10596

(2) 配列番号16の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 51
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号16:

ATGAAGGCGC CGCGCTGCTG TGCACTCGGC ATGCGTGC CGCTGTTAC 50

C 51

(2) 配列番号17の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 56
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号17:

CACTACTTAC GATGGGGAC ATGCTCTGCA CACGAACTG CACTTGTGG 50

CATGAA 56

(2) 配列番号18の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 22
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号18:

TAGTACTAAC ACTATGATGT CT 22

(2) 配列番号19の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 22
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号19:

TTTACTCTT GACCGTCCAA AG 22

(2) 配列番号20の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 25
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号20:

CACCGGGAGT TGCAAGATICA OCTGCT 25

(2) 配列番号21の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 45
 (B) 型: 様数
 (C) 繩の数: 一本縩
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号21:

AGTTTCTGCG CGCAACGCTAT CATTCTGATC TGGTTGACCT ATTAC 45

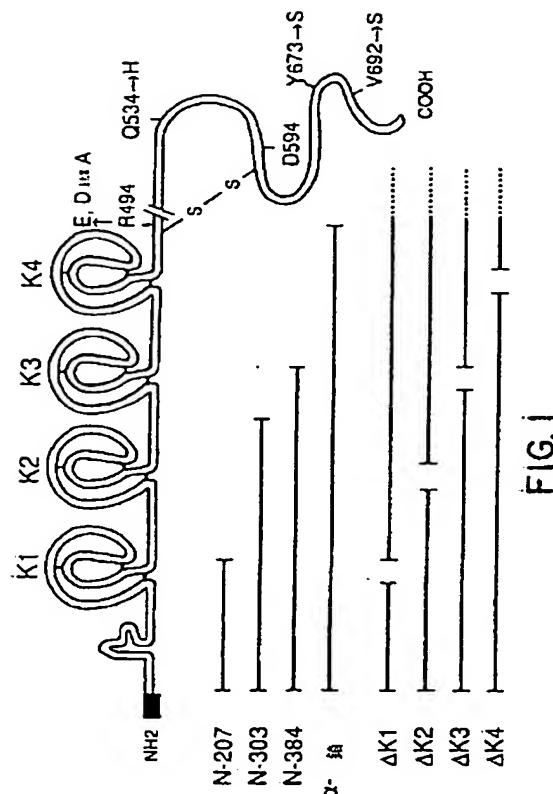


FIG. 1

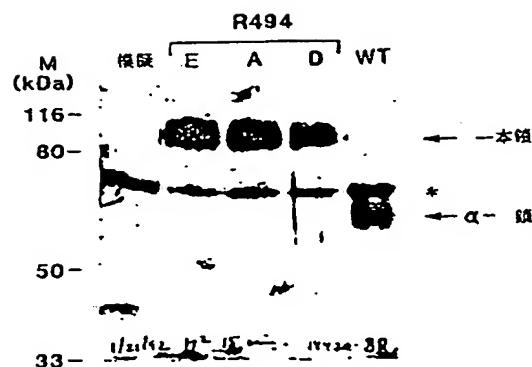


FIG. 2

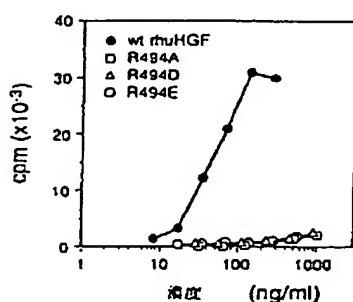


FIG. 3A

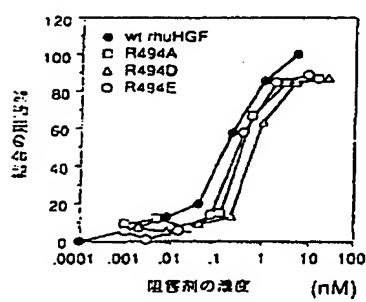


FIG. 3B

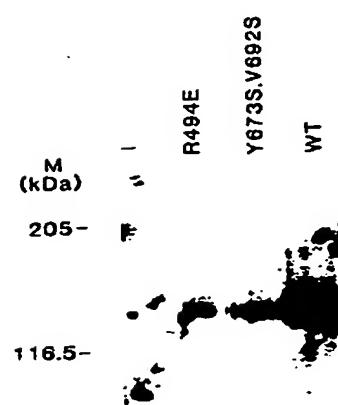


FIG. 4

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 5A

FIG. 5B

GCAACAACTTA
 ATAGACTGGA TGGAGCCGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGCGCTCGCG
 CCTTCCGGCT
 GCGTTGTTA TTGCTGTATA ATCTGGAGCC GTTGAGCCG TGCTCAGCGG
 TATCATGCTT
 GCGCTGGGC CAGATGTTA GCCCTCCCGT ATCGTAGTT TCTACACGACT
 GGGGAGTCG
 GCAACTATGC ATGAAACAAA TAGACAGATC GCTGAGATAC GTGCCCTRACT
 GATTAAACGT
 TGTGAACTGT CACACCAAGT TTACATCATAT ATACCTTTAGA TTGATTTAAC
 ACTTCATTTT
 TAATTTAAA GGATCTAGGT AAAGATCCTT TTGATAATAC TCATGACCAA
 AATCCCTTAA
 CGCTGAGTTT CGTTCACACTG ACCGTCAGAC CCCCTAGAAA AGATCAAGG
 ATCTCTTCTT
 GATCCCCCTT TTGCGCCCGT AATCTGCTGC TTGCAAAACAA AAAAACACCC
 GCTACCAAGG
 TGTGTTGTT TGCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTC CGAAGGTAAC
 TGGCTTCAGC
 AGCGCGAGA TACCAAATAC TGCTCTCTA GTGAGGCCG ACTTACGCCA
 CCACCTTCRAG
 AACCTCTAG CACCCGCTAC ATACCTCCTC CTGCTAATCC TTGTTACCACT
 GGCCTGCTGC
 AGTCGGATA AGTCGCTCT TACCGGGTTC GACTCAAGAC GATAGTTAC
 GGTATAAGGG
 CACGGCTCGG GCTGAAACGGG GGGTTCTGTC ACACAGCCCA GCTTGGACCG
 AACGGACCT
 ACCGAACTCA CATACTACA CGCTGAGCAT TGAGAAAGCC CAACGCTTC
 CGAAGGCTT
 AACGGGACA GGTATCCGGT AAGGGCGAGG GTCCGAAACAG GAGAGCGCAC
 GAGGGGGCTT
 CGACGGGAA ACCTCTGGTA TCTTATAGT CCTGTCGGGT TTGCGCCACT
 CTGACTTTCG
 CGTCGATTTTG TGCTGATGCTC GTCAAGGGGG CGGAGGCTAT GCAAAACCC
 CACCAAAACGG
 GCGTTTTACG GCTTCTGGC CTTTGTCTGG CCTTTGCTC ACATGTTCT
 TCTGCGCTTA
 TCCCTGCTATT CTGCGATTA CGGTATTACCG GCTTTGAGT GAGCTGATAC
 CGCTGCGGCG
 AGCCGAAACGA CGGACGGCG CGACTCACTG ACCGAGGAAG CGGAAGAGC
 <N1318>T>
 GCGGAAATACGGAA
 ACCCCCTCTCCCGCGCGTGGCGGATTCTAAATCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGA
 CTGGAAACGGCAGTGAGGCGAACGCAAAATTAATGCTGAGTTACCTCACTCATAGGCA
 CGACGGCTTACACTTATGCTTCTGGCTCTATGTTCTGTGGAATTGTCAGGCCATAACA
 ATTTCAACACGACAAACAGCTATGACCATGATTAC
 GAATTA

FIG.5C

```

><pCIS.EBON
>< Steve Williams Junc 1988により組み立て
>< 選択性 DRK
>< EBNA-1 ori P, neoRと共に
>< パリソンカ部位： XbaI, HindIII, NotI

>< CMVエンハンサー／プロモーター

TTCAGGCTCGCCCGACATTTGATTA
TGTGGGTTGGTAACTTAAAGTAACTCAATTACGGGGCTCATTAAGTTCATAGCCC
ATATAATGGGAGTCGCCGTTCTTCAACTAACCTTACGGCTAAATGGGGCCCTGCCT
GACCCCGGCCCCACCGGCTTCCGGGCTTCAACTAACCTTACGGCTAAATGGGGCTTCC
ATAGTAGGCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCC
ACGGCTTAACTTGGGCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCC
CGGGCCCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCCGGGCTTCC
CGCTGATGGGCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCCGGG
ATGCTATCGCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCCGGG
CTGGATGGGCTTCAATTGGGACTTCTTCACTAACCTTACGGCTTCCGGGCTTCCGGG
GTCGAATGGGAGTTGTGTTGGGACCAAAAATCAACGGGCAATTTCACCAAAATG
CTCAAACTACCGCCCTTCAATTGGGACTTCAACGGGCAATTGGGGGTAGGGTGTAGGGT
GGGGAGCTTCTATAAAGCAGGGCTCGTTAGTGACCGG
< RNADEM >
TCATACGCCCTGG
ACAGCCCGATTCGCGCTGTCTTGGACCTTCATAGAAGACACCGGGAAAGATG
CAEGCTTCCGGCGCCGGAAAGCTGGCATTTGGAACCGGGATTCGGGCTGGCA
AGAGTTCGGCTTAACTACCCCTTATAGAGCTTATAGCCCGAACCGGGCTGGCT
>< eop プロモーター >
<GGCCCTTCCCCCTGGCT>CTTGTAGAACGGGGCTACAATTAACTACATACCC
TATATGTTATCATACACATACAGATTAGGTGACACTATA>< sp6
sites>GATAACATACACTTTGCCCTTC
```

RNA

```

ACATCTTCACTTCTTCTTC
ACAGGTGCTCACTTCAAGGCTCAAGPstI-ClaI クランナー→CTGCA
>< 9' ローニングリソウ → CCTCGGGTCT
ATCGATTCCTCGA

< EcoRI / 9' レナウ > GAATTARTTC

AAGCTTGGGGGGGGAGCTT
GGCGCCCATGGCC
>< 444位 A > AACATTGGGTTATTCGAGCTTAAATGGTT
ACAATAATAGACGATACCATCACAAATTTTCAAAATAAGCATTTTTCACTGCAATTCA
CTGGGGTTCTTCAGCAACTCATCACATGTATCTTATGATGCT
GATCGATCGG
>< 3'
```

FIG. 6A

GCTTACCCAGG						
GTGCTTTCTT	TGCCGGATCA	AGAGCTTACCA	ACTCTTTTTC	CGAAGGTAAC		
TGGCTTCAAG	AACGGCCAGA	TACCCANATAC	TGTCCTTCTA	GTGTAGCCGT	ATTAGGCGCA	
CCACTTCTGC	AACTCTGTAG	CACCCGGCTAC	ATACCTGCT	CTGCTAAATCC	TCTTACCACT	
GGCTGTGCCC	ATGGGGCATA	AGTCGCTGCT	TACCGGGTTG	GACTCTRAGAC	GATAGTTTAC	
GGGATAACGCC	CAGGGCTCGG	GCTGAACGGG	GGGTTCGTGC	ACACAGCCCCA	GCTTGGAGCG	
AACCGATCTA	ATGGGATCTGA	GATACCTACA	GCGTGAGCAT	TGCAAAGCG	CCACGGTTCC	
CGAAGGGGAA	AAGCCGGACA	GGTATCCGGT	AAAGCCGAGG	GTCGGAAACAG	GAGAGCGCAC	
GGGGGGGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCCCTGGTA	TCTTTATAAGT	CCCTCTGGGT	TTGCEAACCT	
CTGACTTGAAC						

><749 PVO>

<突然変異により導入されたPvuII部位：削除された228bp PvuII断片>

＜PKSの4522のPwIIに適合？＞

<PR304820>P W1118
 CTGGCAGACAGGTGCCGA
 CTGGGAAACGCCGCTAGTGACCGAAGCAATTAAATGTCAGTTACCTCACTCATTAAGGCACC
 CCAACGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTGCTATGTTGTCGAAATTGTGAGCGGGATAACA
 ATTTTCACACAGCAAAACAGCTATGCCATGATTAC
 GAAATA

FIG. 6F

H-50175474-COPY NUMBER 2 FOR RELEVANT INFORMATION FROM THE SEARCH RESULTS		SEARCHED AND INDEXED BY	PCT/US 93/04648
CATEGORY	CLASSIFICATION OF DOCUMENTS, AND INDICATIONS CONCERNING THE RELEVANT PORTION	SEARCHED	SEARCHED AND INDEXED
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS vol. 180, no. 2, 31 October 1991, DULUTH, MINNESOTA US pages 1151 - 1158 NOBUKUNI SHIMURA ET AL. "Tumor cytotoxic factor / hepatocyte growth factor from human fibroblasts: cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein" see abstract see page 1151, paragraph 1 - page 1152, paragraph 1; figure 1 see page 1154, paragraph 2 - page 1157, paragraph 1 -----	16-25, 41-42, 49-53	
D,X	ENDO JOURNAL vol. 11, no. 7, July 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 2503 - 2510 NATHALIE A. LOKER ET AL. "Structural and functional analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding" see abstract see page 2505, left column, paragraph 3 - page 2508, right column, paragraph 1 -----	1-7, 9-12, 15-41, 46-53	
P,E	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 267, no. 28, 5 October 1992, BALTIMORE, MD US pages 20314 - 20319 DAIJI NAKA ET AL. "Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer" see abstract see page 20314, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 2 see page 20316, right column, paragraph 2 - page 20318, right column, paragraph 2; figure 4 -----	1-7, 11-12, 15-17, 16,37, 49-53	

International Application No.		PCT/US 93/04568
W.H. MARZLUFF FORMULATED TO 04:000 AVANT		4 CARBONIZED PAPER USE, RECORDED 6/10/93
Category 1	Number of Transmissions, non-electronic, where expression, or use, contains language	Language or Character Set
P.K	FEDS LETTERS. vol. III, no. 1, October 1992, AMSTERDAM NL pages 17 - 21 CHI CAK ET AL, 'Processing of hemocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity' see page 17, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 1 see page 18, right column, paragraph 2 - page 20, left column, paragraph 1	1-7, 9-12,15, 36-39, 49-53

BEST AVAILABLE COPY

田原 検索報告

PCT/US91/04648

Item 1: International Search Report under Article 17(3)(b) of the Patent Convention.

The international search report has been conducted in respect of certain claims under Article 17(3)(b) for the following reasons:

Claims A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z.

Remark: Although claim S5 is directed to a method of treatment of the human body the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

Claims A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z.

Remark: This refers to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements as such or which contain no meaningful claim matter which can be derived from, specifically.

Claims A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z.

Remark: Only the claim(s) concerned and not the other parts of the application, and the general and brief summary of this section.

Item 10: Non-relevant prior art cited by the examiner in the search report (Continuation of item 2 of first sheet).

The International Examining Authority found no relevant documents in this international application, as follows:

An additional search has been already paid by the applicant, the international search report covers all relevant documents.

An additional search could be waived without effect pending payment of addressed fee, the authority did not waive payment of any additional fee.

An early copy of the required additional search has been already paid by the applicant, the international search report covers very those areas for which few more fees, specifically claimed here.

No required additional search has been already paid by the applicant. Consequently, the international search report is sufficient for the examination that is concerned as the subject is covered by claims 1-12.

Comment on charges:

- The additional search has been undertaken by the applicant's choice.
- The offices compensate the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/200 (continuation of first sheet) (17B) (July 1993)

This document form was adopted jointly by the European Patent Office (EPO) and the International Bureau of the World Intellectual Property Organization (WIPO) for the International Search Report.

The European Patent Office is at its very earliest the most effective vehicle for the purpose of information. 27/03/93

Patent document cited as search report	Publication date	Priority date	Publication date
WO-A-9205384	02-04-92	AU-A- 6559591 CA-A- 2001700	15-04-92 15-03-92

For latest details about this office: see Official Journal of the European Patent Office, No. 02/92

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 延内整理番号 F I

C 07 K 14/475 8318 -4H

C 12 N 5/10

15/09

//(C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

(C 12 N 5/10

C 12 R 1:91)

(C 12 N 15/09

C 12 R 1:91)

9455 -4C

A 61 K 37/24

(C 12 N 15/00

C 12 R 1:91)

(C 12 N 5/00

C 12 R 1:91)

A

B

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), CA, JP, US

(72) 発明者 マーク、メラニー・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア94061、レ
ッドウッド・シティー、ナンバー204、ハ
ドソン・ストリート1548番